

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ADRIANA DE OLIVEIRA CHRISTOFF

**EFEITOS DO VENENO E DA TOXINA DERMONECRÓTICA
RECOMBINANTE LiRecDT1 DE *Loxosceles intermedia*
EM FÍGADO DE RATO**

CURITIBA

2008

Adriana de Oliveira Christoff

**EFEITOS DO VENENO E DA TOXINA DERMONECRÓTICA
RECOMBINANTE LiRecDT1 DE *Loxosceles intermedia*
EM FÍGADO DE RATO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Alexandra Acco

**CURITIBA
2008**

DEDICO este trabalho a minha filha, minha vida, Gabriela Oliveira Christoff;
meu marido, Paulo Christoff, meu porto seguro; meus pais, Erondina Alves de
Oliveira e Ademir Aparecido de Oliveira, por todo amor e por quem sou; minha
mana querida, Anabel de Oliveira. Muito obrigada por vocês me apoiarem e
confiarem em mim sempre.

Essa vitória é nossa!!!!!!

Amo todos vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus! Obrigada por me socorrer, quando levantei os olhos para os montes e pedi socorro, por não deixar que meus pés resvassem em alguma pedra, não dormir, nem adormecer, ser meu abrigo sempre ao meu lado pelo sol não ter me feito mal, nem a lua durante a noite; por ter me resguardado de todo o mal; velar sobre a minha alma; guardar meus passos agora e para todo sempre.

(salmo 120)

À minha filha querida e ao meu marido, por me ajudarem, compreenderem e pelo amor de vocês, que me dá forças todos os dias. Filha, você foi o melhor e maior presente de Deus, pois a sua chegada, exatamente ao final do primeiro ano de mestrado, me trouxe muitas alegrias, e sentido para minha vida. Meu piqueno querido, sem você nada disso aconteceria.... Obrigada pela amizade, pelo incentivo e por você fazer parte de tudo isso ao meu lado. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus pais, por estarem comigo em mais esta importante etapa da minha vida. Vocês são os meus alicerces, agradeço sinceramente por todos os ensinamentos e pela educação que vocês me deram. Amo vocês!!!

À Profa. Dra. Alexandra Acco, que além de ser uma orientadora incrível, se tornou uma grande amiga!!! Obrigada pelos ensinamentos, pela dedicação, pela compreensão em todos os momentos e por ter aceitado logo no início ser vovó científica. Tenho muito respeito e imensa admiração por você. Muito obrigada!

À Bel.... Minha amiga, irmã, estagiária, confidente.... Você é muito especial. Obrigada por ser exatamente assim, como você é. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas horas de conversa, pela sua paciência que foi infinita, pelo seu apoio e incentivo... Ah! e por sua fé nos farmacêuticos!!! Amo muito você!!!

Às amigas que ganhei, Olga e Kátia. Vocês foram fundamentais nesta pesquisa. Obrigada pela paciência, ajuda, disposição, pelo veneno, pelas toxinas, pela imuno, amizade e por todos os ensinamentos. Vocês são cientistas fantásticas!!!! Adoro vocês!!!!

Às minhas colegas de laboratório Daiana ("I C de ouro"), Vanessa, e em especial a minha amiga Amanda. Obrigada por toda ajuda com os experimentos e pela amizade....por estarem sempre presentes quando eu mais precisei...Adoro Vocês!!!!

A todos os amigos que fiz nesses anos, que me ajudaram em experimentos, no aprendizado e simplesmente contribuíram com a sua amizade. Agradeço em especial à Lea, Aedra, Cris, Juliana, Giuliana, Ana Claudia, Evellyn (muita ajuda na estatística...nunca vou me esquecer), Stefani, Bárbara, Edmar, Marcelo, Mariza, Scheila e Evelise. Vocês são muito especiais e vou lembrar de vocês por toda a minha vida!!!!!!

A todos do laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, da Biologia Celular, especialmente, ao Prof. Dr. Sílvia Sanches Veiga. Obrigada pelo espaço concedido em seu laboratório, pelos materiais e por toda a colaboração científica neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adelar Abracht, da Universidade Estadual de Maringá, por permitir que os experimentos de perfusão fossem realizados em seu laboratório. Obrigada pelo espaço e pela colaboração científica. A todos do seu laboratório, pela ajuda durante os experimentos e pela recepção, que foi ótima.

Ao Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles, pela ajuda com as lâminas da histologia e ainda, obrigada pela sua gentileza em todos os momentos.

À farmacêutica do departamento de farmacologia, Silvinha.... Obrigada por sua colaboração, e por ter se tornado uma grande amiga!!!

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, pela contribuição na minha formação, e pelo exemplo de vida. Especialmente, agradeço às professoras Roseli e Maria Vital, pela amizade e por serem tão belamente mestres.

À professora de inglês, e minha amiga, Suzana, pelo bom humor, e por todos os ensinamentos.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, Alessandra e a amiga Cris, por todo trabalho e dedicação aos alunos da pós-graduação.

A todos os colegas do departamento, por criarem um ambiente agradável, com respeito e companheirismo.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço de coração a todos vocês.

Muito obrigada!!!

“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano,
mas sem ele, o oceano seria menor”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Os acidentes envolvendo aranhas marron (*Loxosceles* sp) tornaram-se um problema de saúde pública no Brasil, principalmente no estado do Paraná, o qual notifica grande número de acidentes causados pelas picadas de aranhas do gênero *Loxosceles*, tendo, portanto, grande relevância clínica. O conjunto de sinais e sintomas da intoxicação é chamado de loxoscelismo, o qual é caracterizado por lesões dermonecroticas e distúrbios sistêmicos. O loxoscelismo sistêmico é a forma mais rara, no entanto, é causa de óbitos por distúrbios hematológicos e insuficiência renal, principalmente. O veneno de *Loxosceles intermedia* é composto por muitas proteínas com atividades diversas, sendo a fosfolipase D a toxina mais estudada e caracterizada e uma das principais responsáveis pelos sinais sistêmicos da doença. Atualmente já foram clonadas, expressas e purificadas 5 isoformas, sendo que a primeira delas (LiRecDT1) foi utilizada no presente trabalho. Atualmente, não há estudos suficientes que demonstrem o envolvimento do fígado na forma sistêmica da doença, mesmo havendo relatos de aumento das transaminases hepáticas em humanos após o envenenamento. Sendo o fígado o principal órgão biotransformador do organismo e que se ajusta às necessidades metabólicas em condições fisiológicas e patológicas, e estando intimamente relacionado aos efeitos toxicológicos e terapêuticos de toxinas e fármacos, é pertinente inferir que este órgão pode ser alvo do veneno de *Loxosceles*, e que as alterações hepáticas poderiam comprometer o quadro clínico dos pacientes. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar se o veneno e a toxina dermonecrotica recombinante LiRecDT1 induzem alterações bioquímicas morfológicas e metabólicas em fígado de ratos Wistar machos tratados com 80 µg de veneno, toxina LiRecDT1 ou PBS. Após 2, 4, 6 e 12 horas o sangue e o fígado foram coletados. No plasma foram dosadas AST, ALT, LDH, γGT e uréia, sendo que em 6 h após a inoculação de veneno ou toxina as enzimas AST, ALT, e γGT sofreram alterações significantes no grupo veneno e somente a ALT no grupo toxina. Os fígados foram submetidos a preparações para a coloração de hematoxilina e eosina, sendo que alterações histológicas foram encontradas após 6 e 12 h, principalmente no grupo veneno, que apresentou hepatócitos com tumefação, células apoptóticas e infiltrado de leucócitos mono e polimorfonucleares na região portal. Após 12 h apresentou alto grau de esteatose. O grupo toxina apresentou alterações mais discretas nos mesmos tempos. A técnica de imunofluorescência com anticorpo específico para veneno ou toxina, mostrou-se positiva para os dois grupos tratados, em 6 e 12 h. Ocorreram também alterações metabólicas após 6 h, demonstradas pela técnica de perfusão monovascular em fígado isolado. A produção de glicose e uréia a partir da alanina diminui nos animais tratados com o veneno, sendo que tanto a gliconeogênese quanto a glicogênese sofreram alterações em animais em jejum e alimentados. Esse conjunto de achados evidencia que o veneno tem ação hepatotóxica e que fosfolipase D contribui para tal efeito, não sendo a única responsável pelo dano hepático encontrado.

Palavras-chave: Aranha-marrom. *Loxosceles intermedia*. Loxoscelismo. Fígado. Metabolismo.

ABSTRACT

The accidents with brown spiders (*Loxosceles* sp) became a public health in Brazil, mainly in Paraná State, which has the greatest notification of *Loxosceles* accidents. The clinic manifestations of spider intoxication are named loxoscelism, which is evidenced by dermonecrotic lesions and systemic disturbs. The systemic loxoscelism is not the usual manifestation, but is the cause of death in this intoxication due to the renal and hematological alterations. *Loxosceles intermedia* venom composition includes many active proteins, like phosphatase D. This enzyme is the most studied and characterized venom protein and is responsible for systemic signals of loxoscelism. Until this moment, five phosphatases isoforms were cloned and purified, but only the first one (LiRecDT1) was used in this study. Despite the reports of increased hepatic transaminases levels in humans being with loxoscelism and despite the liver involvement in intoxications, there are not enough studies that make a correlation between liver and *Loxosceles* venom. The aim of this study was to investigate if the venom and the dermonecrotic recombinant toxin 1 (LiRecDT1) produce biochemical, morphological or metabolic alteration in the rat liver. Wistar rats (n=5) were treated subcutaneously with 80 µg venom, 80 µg toxin or buffer (PBS) and after 2, 4, 6 and 12 hours the blood and the liver were collected. AST, ALT, LDH, γGT and urea were measured in plasma by spectrophotometric methods. The enzymes AST, ALT and γGT showed significant elevation in the venom group 6 hrs after the treatment, but in the toxin group only ALT was elevated. Collected livers were submitted to histological and immunofluorescent preparation. After 6 and 12 hrs of treatment, the hepatocytes from the venom group were tumefacted and apoptotic, and leucocytes infiltration in portal region was present. Additionally, a high degree of steatosis was presented in 12 hrs. In the toxin group the liver histological alterations were more discrete. At the same time, 6 and 12 hrs, the immunofluorescence was positive in both, venom or toxin liver. Hepatic metabolism was modified 6 hrs after the treatment: the venom reduced the gluconeogenesis and ureagenesis from alanine and the glycogenesis. These results make evident that the *Loxosceles intermedia* venom is hepatotoxic and that LiRecDT1 toxin is responsible for part of this effect, but alone this toxin is not able to reproduce the total venom hepatic lesions.

Key words: Brown spider. *Loxosceles intermedia*. Loxoscelism. Liver.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Frequência de picadas por <i>Loxosceles</i> no estado do Paraná.....	04
FIGURA 2	– Mapa das distribuições das espécies do gênero <i>Loxosceles</i> por municípios do estado do paraná.....	04
FIGURA 3	– Exemplar de <i>Loxosceles intermedia</i>	05
FIGURA 4	– Toxicidade do veneno de <i>Loxosceles</i>	06
FIGURA 5	– Análises bioquímicas plasmáticas realizadas em sangue periférico de ratos tratados com veneno de <i>Loxosceles intermedia</i>	27
FIGURA 6	– Análises bioquímicas plasmáticas realizadas em sangue periférico de ratos tratados com toxina dermonecrótica recombinante de <i>Loxosceles intermedia</i> (LiRecDT1).....	28
FIGURA 7	– Curva bioquímica plasmática de tempo-resposta em ratos Wistar (n=5) tratados com veneno bruto (80µg), toxina LiRecDT1(80µg), ou PBS.....	29
FIGURA 8	– Imunofluorescência analisada em microscópio confocal. Fígado de rato controle – não tratado.....	31
FIGURA 9	– Imunofluorescência analisada em microscópio confocal. Fígado de ratos tratados com o veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> (80µg) coletados após 2 e 4 h.....	32
FIGURA 10	– Imunofluorescência analisada por microscopia confocal. Fígado de ratos tratados com o veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> (80µg) coletados após 6 e 12 h.	33
FIGURA 11	– Imunofluorescência analisada por microscopia confocal. Fígado de ratos tratados com a toxina LiRecDT1 de <i>Loxosceles intermedia</i> (80µg) coletado após 2 e 4 horas.....	34
FIGURA 12	– Imunofluorescência analisada por microscopia confocal sobre o tecido hepático de ratos expostos a toxina LiRecDT1 coletados após 6 horas de tratamento.....	34
FIGURA 13	– Imunofluorescência analisada por microscopia confocal sobre o tecido hepático de ratos expostos à toxina LiRecDT1 coletados após 12 h. ...	35
FIGURA 14	– Lâminas de fígado de ratos tratados com veneno de <i>Loxosceles intermedia</i> , corados com hematoxilina e eosina. Grupo controle e coletados após 2, 6 e 12 h.	37
FIGURA 15	– Lâminas de fígado de ratos tratados com LiRecDT1, coletados após 6 e 12 h.	40
FIGURA 16	– Influência do veneno e da toxina de <i>Loxosceles intermedia</i> no metabolismo hepático de animais alimentados. As amostras foram coletadas a cada 2 minutos durante 50 minutos de perfusão, após 6 horas da inoculação do veneno, da toxina ou PBS.....	42
FIGURA 17	– Influência do veneno e da toxina de <i>Loxosceles intermedia</i> no metabolismo hepático de animais em jejum. As amostras foram coletadas até 60 minutos de perfusão, após 6 horas da inoculação do veneno, da toxina ou PBS. Após dez minutos de perfusão, ocorreu a entrada do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato com alanina 2,5 mM..	44
FIGURA 18	– Influência do veneno e da toxina de <i>Loxosceles intermedia</i> no metabolismo hepático de animais em jejum. As amostras foram coletadas até 60 minutos de perfusão, após 6 horas da inoculação do veneno, da toxina ou PBS. Após dez minutos, ocorreu a entrada do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato com alanina 2,5 mM.....	45

FIGURA 19	–	Influência do veneno bruto de <i>Loxosceles intermedia</i> no glicogênio hepático.....	46
------------------	---	--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Testes laboratoriais realizados na admissão de dois pacientes com loxoscelismo sistêmico 48 horas (caso 1) e 6 horas (caso 2) após o envenenamento.....	13
TABELA 2	– Esquema de doses de veneno e de toxina inoculados em ratos.....	19
TABELA 3	– Composição salina do tampão Krebs/Henseleit-Bicarbonato.....	23
TABELA 4	– Alterações avaliadas em lâminas de fígado de ratos 2, 4, 6 e 12 h após a inoculação subcutânea de veneno bruto de <i>L. intermedia</i> (80µg) ou PBS (controle).....	36
TABELA 5	– Alterações avaliadas em lâminas de fígado de ratos 2, 4, 6 e 12 h após a inoculação subcutânea da toxina LiRecDT1 de <i>L. intermedia</i> (80µg) ou PBS (controle).....	39
TABELA 6	– Influência do veneno e da toxina de <i>Loxosceles intermedia</i> no metabolismo hepático de animais alimentados. As amostras foram coletadas até 50 minutos de perfusão, após 6 horas da inoculação do veneno, da toxina ou pbs.	43
TABELA 7	– Influência do veneno e da toxina de <i>Loxosceles intermedia</i> no metabolismo da alanina, infundida na concentração de 2,5 mM. As amostras foram coletadas até 60 minutos. O veneno (80µg) e a toxina (80µg) foram injetados nos animais e o fígado perfundido após 6 horas.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CPPI – Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos

DAPI - 4-6-diamidino-2-fenilindole dicloreto

LC – Loxoscelismo cutâneo

LDH – Lactato desidrogenase

LIPAPE – Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em animais peçonhentos

LiRecDT1 – Toxina dermonecrótica recombinante de *Loxosceles intermedia* 1

LVC – Loxoscelismo víscero–cutâneo

PBS – Solução tampão fosfato

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 CARACTERÍSTICAS DO VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i>	06
2.2. MANIFESTAÇÕES DO LOXOSCELISMO	08
2.2.1. Loxoscelismo cutâneo	09
2.2.2. <i>Loxoscelismo Sistêmico ou Viscero-Cutâneo</i>	10
2.3. TOXINA RECOMBINANTE	15
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	16
4. JUSTIFICATIVAS	17
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1. EXTRAÇÃO DO VENENO E OBTENÇÃO DA TOXINA RECOMBINANTE	17
5.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	18
5.3. AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE VENENO E TOXINA	18
5.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS NOS TEMPOS 2, 4, 6 E 12 HORAS APÓS TRATAMENTO COM VENENO TOTAL OU TOXINA LIRecDT1 NA DOSE DE 80µg (CURVA TEMPO-RESPOSTA)	19
5.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA	20
5.6. ANÁLISE HISTOPATÓGICA HEPÁTICA	21
5.7 PERFUSÃO MONOVASCULAR DE FÍGADO E METABOLISMO HEPÁTICO	22
5.7.1 Perfusão com animais alimentados	23
5.7.2 Perfusão com animais em jejum	24
5.8 DOSAGEM DE METABÓLITOS	24
5.9 DOSAGEM DE GLICOGÊNIO	25
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	25
6. RESULTADOS	26
6.1. AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA DE VENENO E DE TOXINA LiRecDT1	26
6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS TEMPO-RESPOSTA COM VENENO TOTAL OU TOXINA LiRecDT1	29
6.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA	31
6.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA HEPÁTICA	35
6.3.1. Grupo veneno bruto de <i>Loxosceles intermedia</i>	35

6.3.2. Grupo toxina LiRecDT1.....	38
6.5 PERFUSÃO MONOVASCULAR EM FÍGADO E METABÓLITOS DE RATOS EXPOSTOS AO VENENO OU TOXINA.....	40
6.5.1 Animais alimentados tratados com o veneno, toxina ou PBS.....	40
6.5.2 Animais em jejum tratados com o veneno, toxina ou PBS.....	43
6.6 DOSAGEM DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	46
7.0 DISCUSSÃO.....	47
8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
9. REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

Os casos de envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* tornaram-se muito comuns e estão sendo considerados um problema de saúde pública no Brasil e em especial no Estado do Paraná. Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever as lesões cutâneas e sistêmicas decorrentes do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles*. A manifestação cutânea é a forma mais comum, no entanto, 13% dos casos evoluem para a forma víscero-cutânea ou sistêmica, na qual se observam manifestações clínicas decorrentes de hemólise intravascular como anemia, petéquias, equimoses, icterícia e hemoglobinúria, que se instalam geralmente nas primeiras 24 horas após o envenenamento. Casos graves podem evoluir para insuficiência renal aguda, que é a principal causa de óbito no loxoscelismo (CHAIM *et al.*, 2006), sendo que há descrição de elevação nos níveis séricos de uréia no loxoscelismo (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.* 2006), pois, sendo a ureagênese um processo que ocorre essencialmente no fígado a partir de aminoácidos (arginina, alanina, glutamina...), a elevação de níveis plasmáticos de uréia é indicativa de altas taxas de dissipação de nitrogênio e suprimento diferenciado de compostos nitrogenados (CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004), o que pode ser a causa da azotemia no envenenamento por *Loxosceles*.

Outras manifestações clínicas e bioquímicas acometem pacientes com loxoscelismo, como a bilirrubinemia e a elevação significativa de transaminases, que são indicadoras da função hepática. Entretanto, há poucos dados na literatura especializada que correlacionam o loxoscelismo com a função hepática, mesmo sendo o fígado o principal órgão biotransformador do organismo e que se ajusta às necessidades metabólicas em condições fisiológicas e patológicas, estando intimamente relacionado aos efeitos terapêuticos e toxicológicos de fármacos e venenos. Desta forma, é pertinente inferir que este órgão é alvo do veneno de *Loxosceles* e que as alterações hepáticas poderiam comprometer o quadro clínico dos pacientes.

Visando preencher essa lacuna acerca da interferência metabólica no fígado após envenenamento por *Loxosceles*, é que foi realizado este estudo. Para tanto,

foram utilizadas técnicas como perfusão hepática monovascular, imunofluorescência, histologia e análises enzimáticas, que esclarecerão questões aventadas sobre o veneno e a toxina recombinante LiRecDT1 de *Loxosceles* em fígado, a fim de contribuir para o conhecimento da fisiopatogenia do loxoscelismo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No Brasil, as picadas por aranhas do gênero *Loxosceles* vêm sendo reportadas desde 1891 e atualmente são consideradas um problema de saúde pública no sul do Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2007). O Paraná é o Estado brasileiro que notifica o maior número de acidentes por aranhas *Loxosceles* no país, sendo 595 picadas registradas entre 1988 e 1989, 923 em 1990 (RIBEIRO *et al.*, 1993) e 20.699 acidentes entre 1993 e 2000, ou seja, 2.957 picadas por ano (MARQUES-DA-SILVA & FISCHER, 2005). Em um estudo realizado no período de 1993 a 2000, Curitiba e região metropolitana foram responsáveis por 76% (15.655) dos casos de acidentes por aranhas *Loxosceles* no Paraná (MARQUES-DA-SILVA; SOUZA; FISHER, 2006). A faixa etária de 21 a 40 anos é a mais predisposta, e as mulheres são mais acometidas por acidentes (68%) do que os homens (32%) (GUBERT, 2005). Índices mostram que 23% das picadas por *Loxosceles* são na região da coxa, 16,7% no tronco, 14% nos braços e 13% na região dos pés (Secretaria da Saúde, Curitiba, Paraná, Brasil, 2002). A maioria dos acidentes acontece à noite, enquanto as pessoas dormem e no momento de colocar as roupas, quando as aranhas se sentem ameaçadas, pois diferente de outros artrópodos e ofídios, as aranhas do gênero *Loxosceles* não apresentam comportamento agressivo, sendo os acidentes provocados por compressão do animal sobre a pele (SUAREZ *et al.*, 1971; LUCAS, 1988; FUTRELL, 1992). A maioria dos acidentes acontece quando a temperatura ambiente se encontra elevada, ou seja, os meses onde há uma maior prevalência de loxoscelismo (FIGURA 1) são os de novembro a março (Ministério da Saúde do Brasil, 2004; MARQUES-DA-SILVA; SOUZA; FISHER, 2006).

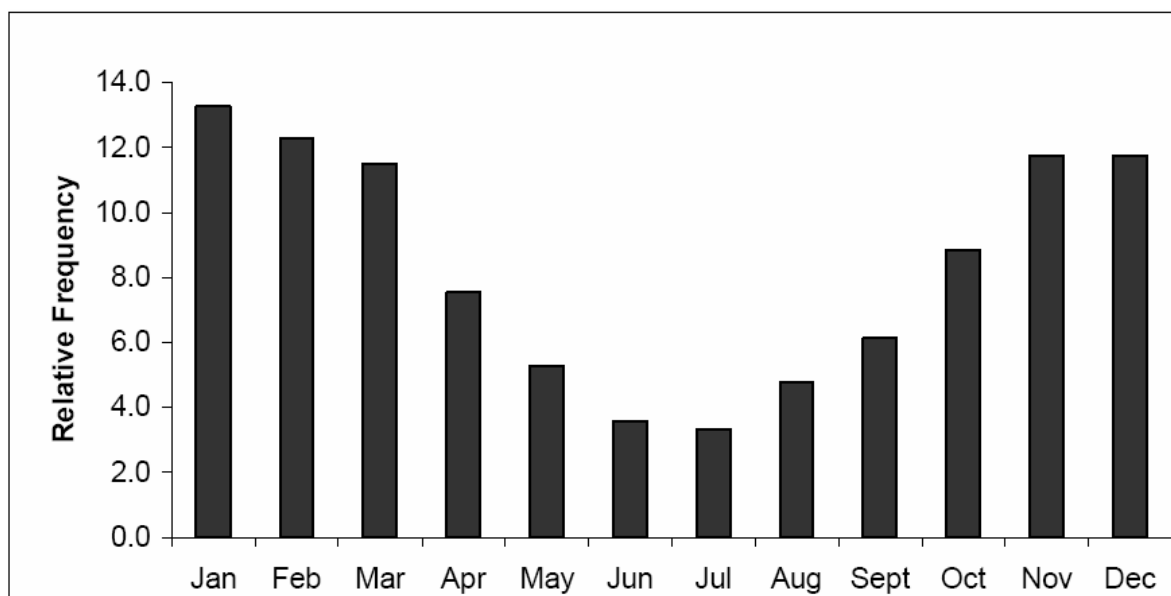


FIGURA 1- Frequência de picadas por *Loxosceles* no Estado do Paraná, 1993-2000.

FONTE: MARQUES-DA-SILVA; SOUZA; FISHER (2006)

No Paraná estão presentes quatro das sete espécies de *Loxosceles* encontradas no Brasil (FIGURA 2): *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gaucho* e *L. hirsuta* (MALAQUE *et al.*, 2002).

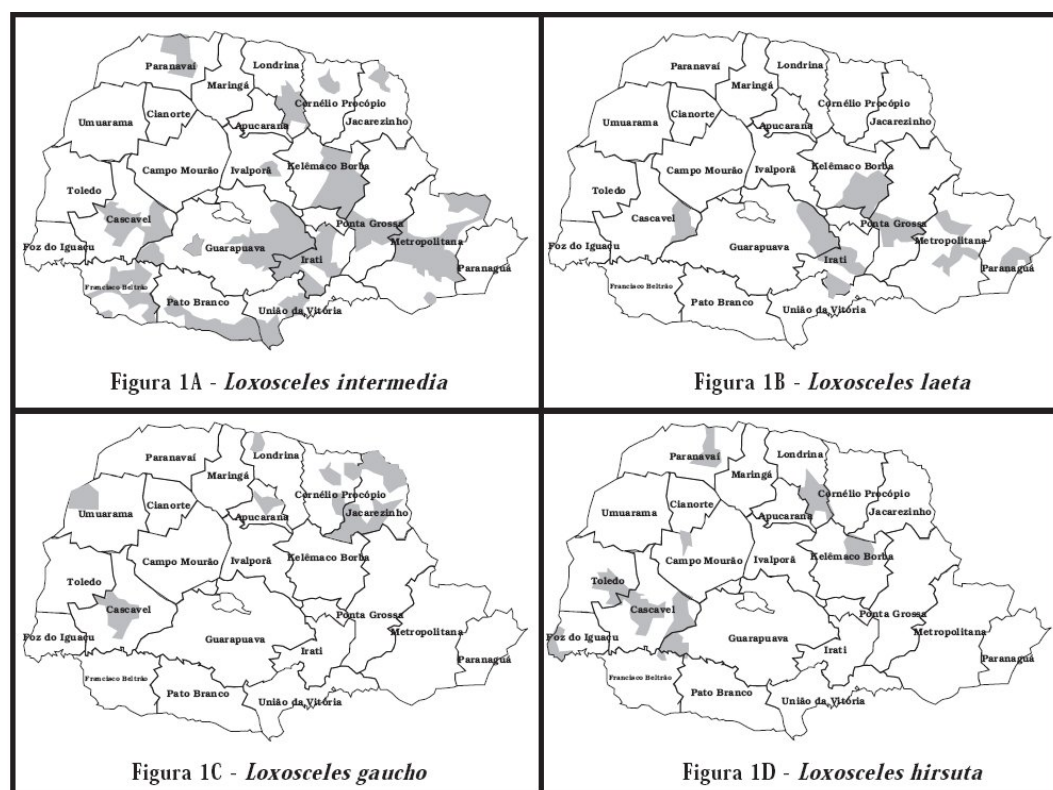


FIGURA 2 - Mapas de distribuições das espécies do gênero *Loxosceles* por Municípios do Estado do Paraná.

FONTE- MARQUES-DA-SILVA & FISCHER (2005)

A espécie com maior percentual de exemplares (1.051- 65,1%) nas coleções consultadas por MARQUES-DA-SILVA & FISCHER (2005), foi a *L.intermedia* (FIGURA 3), a qual foi também que apresentou a distribuição mais ampla pelo Estado, tendo sido encontrada em todas as regiões do Estado do Paraná, abrangendo 50 municípios agrupados em 13 regionais de saúde.



FIGURA 3 - Exemplar de *Loxosceles intermedia*.
FONTE-SILVA *et al.* (2004)

Nesses locais pode ser encontrada no intra- e peridomicílio. Estas aranhas são classificadas como ocofílicas sinantrópicas devido à adaptação a ambientes residenciais, nos quais encontram boas condições para seu desenvolvimento, suportando temperaturas que variam de 8 a 43°C (FISHER, 1994). Podem sobreviver por períodos superiores a 200 dias sem alimento e quanto à periculosidade, ambos os sexos são venenosos (FUTRELL, 1992).

O estudo da atividade biológica do veneno das três espécies principais presentes na região sul, mostrou que o veneno da *L. intermedia* é o mais letal (DL₅₀ 0,48 mg/Kg), seguido da *L. gaucho* (DL₅₀ 0,60 mg/Kg) e da *L. laeta* (DL₅₀ 1,45 mg/Kg) (BARBARO *et al.*, 1996). Outro resultado de um estudo realizado entre duas diferentes espécies de *Loxosceles*, a *intermedia* e *laeta*, e entre o sexo destas espécies, revelou que a severidade do loxoscelismo depende em parte destes quesitos, pois o veneno varia com o estágio oncogênico do desenvolvimento do sexo das aranhas (ANDRADE, *et al.*, 1999), mas o veneno de fêmeas de ambas as espécies possui maior toxicidade, dentre elas, o veneno da *Loxosceles intermedia*

mostrou ser mais letal do que a da *L. laeta* (FIGURA 4) (OLIVEIRA *et al.*, 2005), confirmando estudos anteriores. O veneno da *L. intermedia* em humanos parece ser o responsável pelas manifestações mais severas do loxoscelismo (SEZERINO; ZANNIN; COELHO, 1998).

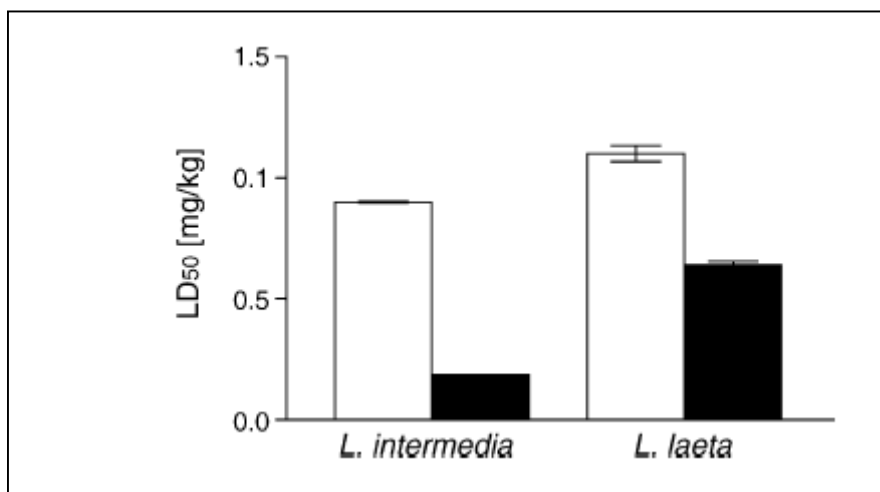


FIGURA 4 - Toxicidade do veneno da *Loxosceles*. Várias doses de veneno de machos (barras claras) e fêmeas (barras escuras) de *L. intermedia* e *laeta* diluídos em PBS foram injetados intradermicamente em camundongos. A DL₅₀ foi calculada através da análise de probitos avaliando as mortes ocorridas em 48 h. Os resultados representam a média \pm desvio padrão.
FONTE: OLIVEIRA *et al.* (2005)

O veneno das fêmeas possui maior concentração de proteínas do que o de machos, chegando a apresentar o dobro de proteínas (SWANSON & VETTER, 2006), fato que pode ser explicado devido às fêmeas serem maiores em comprimento e peso. Inclusive, a severidade de hemólises em eritrócitos humanos é maior quando a fêmea é a responsável pelo envenenamento (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Durante a picada de *Loxosceles*, são injetados aproximadamente 65 a 100 μ g de proteína (DA SILVA *et al.*, 2004), sendo assim, crianças e adultos com baixo peso corporal acabam evoluindo mais rapidamente para a forma mais grave do loxoscelismo, chegando a apresentar com certa frequência os efeitos sistêmicos. No entanto, este é um dado pouco confiável, visto que estudos provaram que a quantidade de veneno que é inoculada durante a picada depende de quanto a aranha se sente ameaçada, pois ela tem a capacidade de variar a quantidade de veneno conforme a gravidade da situação (SWANSON & VETTER, 2006).

2.1. Características do Veneno de *Loxosceles intermedia*

O veneno loxoscélico é um líquido cristalino, que consiste essencialmente de proteínas, as quais são produzidas por glândulas situadas no cefalotórax da aranha que se comunicam com o exterior através do aparelho inoculador constituído por um par de quelíceras (MARTINEZ-VARGAS, 1987). O veneno é uma mistura de proteínas de baixa massa molecular (5 – 40 KDa), na sua grande maioria (DA SILVA *et al.*, 2004), ácidos nucleicos, aminoácidos livres, poliaminas neurotóxicas, monoaminas e sais inorgânicos. Sabe-se que a toxicidade do veneno é decorrente do efeito combinado (efeitos tóxicos sinérgicos) de todos os seus componentes (GEREN *et al.*, 1976). No entanto, já foi demonstrado que as atividades nocivas do veneno são atribuídas a toxinas proteolíticas, que degradam fibrinogênio, fibronectina e proteoglicanas, e rompem estruturas de membranas, resultando em hemorragia local, lesão cutânea, coagulação intravascular disseminada (CID) e insuficiência renal (VEIGA *et al.*, 1999; da SILVA *et al.*, 2004, de SOUZA *et al.*, 2007), quadro que caracteriza as duas manifestações da doença causada pelo envenenamento.

Os mecanismos pelos quais o veneno provoca as suas manifestações estão sob investigação. Várias toxinas têm sido identificadas e caracterizadas no veneno loxoscélico, entre as quais se destacam a fosfatase alcalina, fosfohidrolase ribonucleotídica, hialuronidase, serino-proteases, metaloproteases e fosfolipases D (chamadas inicialmente de esfingomielinasases D) (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000; da SILVA *et al.*, 2004). A metaloprotease (20 a 28 kDa) chamada de Loxolisina A apresenta efeito fibrinolítico e fibrigenolítico, e a Loxolisina B, a qual é conhecida como metaloprotease gelatinolítica de 32 a 35 kDa, está associada com os efeitos necróticos e hemorrágicos presentes no envenenamento (FEITOSA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2000; ZANETTI *et al.*, 2002). A toxina hialuronidase degrada ácido hialurônico e resíduos de condroitina em proteoglicanas, e provavelmente poderia estar envolvida com as lesões dermonecroticas (a seguir descritas) e com o fator de espalhamento sistêmico do envenenamento (YOUNG & PINCUS, 2001).

TAMBOURGI *et al.* (1998) demonstraram que os efeitos locais e sistêmicos

induzidos pela *L. intermedia* estão associados à atividade da fosfolipase D, proteína melhor caracterizada entre as diferentes espécies de *Loxosceles* (BARBARO *et al.*, 2005). Essas são as proteínas que estão em maior concentração no veneno (CUNHA *et al.*, 2003), e que são responsáveis pelos efeitos cutâneos e sistêmicos (TAMBOURGI *et al.*, 1998). As fêmeas de todas as espécies de *Loxosceles* exibem uma maior atividade da fosfolipase D, não havendo variação entre as espécies encontradas no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Mais especificamente, as fosfolipases do tipo D catalisam a hidrólise de esfingomiélin, que é um dos maiores constituintes da camada externa da membrana citoplasmática, produzindo colina e 1-fosfato ceramida. Estudos prévios demonstraram que a esfingomiélinase D, como foi denominada inicialmente, tem uma atividade de lisofosfolipase intrínseca para lisofosfatidil colina. A hidrólise da lisofosfatidil colina para ácido lisofosfatídico é conhecida como uma indutora da agregação plaquetária, hiperpermeabilidade endotelial e respostas inflamatórias (ANDRADE *et al.*, 2006).

2.2 Manifestações do Loxoscelismo

Loxoscelismo é o termo utilizado para descrever lesões cutâneas e reações sistêmicas em consequência do envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* (MARTINEZ – VARGAS, 1987; RIBEIRO *et al.*, 1993; DA SILVA *et al.*, 2004). A apresentação clínica e a severidade do loxoscelismo dependem de vários fatores, como a espécie da aranha, a quantidade de veneno inoculado, bem como a sua concentração, o sexo, idade e estágio de desenvolvimento ontogenético da aranha (BARRETO *et al.*, 1985; SEZERINO *et al.*, 1998; Ministério da Saúde do Brasil, 1998; ANDRADE *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 1999), local da picada (áreas de tecido adiposo resultam em lesões mais graves e evolução para escaras), idade do indivíduo (casos de óbitos são mais frequentes em crianças) (SEZERINO *et al.*, 1998), o tempo até o atendimento médico (BARBARO *et al.*, 1994) e fenótipo e genótipo do paciente (deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase).

Duas variantes clínicas podem ser bem definidas: o loxoscelismo cutâneo (LC) e sistêmico ou loxoscelismo víscero-cutâneo (LVC), os quais ocorrem em 83,3 e 16,7% dos casos, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2005). No loxoscelismo cutâneo, dor, edema e escaras necróticas são as manifestações predominantes

(BARBARO *et al.*, 1992), sendo que o veneno pode romper as estruturas de membrana, degradando-as (VEIGA *et al.*, 2000), e no víscero-cutâneo, são observados hematúria, hemoglobinúria, falência renal, icterícia e febre (RESS *et al.*, 1988; FUTRELL, 1992; LUCIANO *et al.*, 2004).

2.2.1 *Loxoscelismo Cutâneo*

As lesões necróticas foram bem caracterizadas e descritas em 1954 (PAULI *et al.*, 2006). Quando um indivíduo é picado pela via intradérmica por uma aranha do gênero *Loxosceles*, são injetados aproximadamente 65 a 100 µg de proteína e normalmente essa picada é pouco dolorosa e geralmente passa despercebida pelo paciente (DA SILVA *et al.*, 2004). Os primeiros sinais que aparecem são as lesões necróticas cutâneas (FUTRELL, 1992; APPEL *et al.*, 2005). Logo após a picada (2-8 horas), aparecem como sinais e sintomas comuns a dor, de moderada à severa, que é descrita como uma queimação no local da picada (CHAIM, 2005) acompanhada de eritema, inchaço e coceira, e um acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (OSPEDAL *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2003). Após 12 a 24 horas há o aparecimento de uma bolha hemorrágica delimitada por um halo de tecido isquêmico (DA SILVA *et al.*, 2004), que após um a sete dias evolui para uma lesão necrótica de cor violeta azulada, de difícil cicatrização (BARBARO *et al.*, 1994; ZANNETTI *et al.*, 2002). Após seis a oito semanas, a lesão evolui para uma espécie de escara, progredindo para úlcera. Podem surgir como consequência das lesões crônicas, vasculite mediada por leucócitos, que pode produzir lesões como a piodermite gangrenosa (RESS *et al.*, 1988; OSPEDAL *et al.*, 2002), e infecções secundárias por microorganismos, como o *Clostridium perfringens*, atuando de modo sinérgico e agravando as lesões dermonecroticas (MONTEIRO *et al.*, 2002). Essa bactéria, entre outras, pode estar presente nas quelíceras da aranha no momento da picada e é inoculada juntamente com o veneno (CHAIM *et al.*, 2006).

A evolução das lesões acontece caso o indivíduo não procure um serviço médico para tratamento. Com a medicação empregada e assistência médica dentro de 12 horas após a picada, as lesões não evoluem podendo desaparecer brevemente.

O veneno da *L. deserta* induz à expressão do fator de crescimento endotelial

(VEGF) em queratinócitos humanos, sugerindo que o VEGF, pode contribuir para a vasodilatação, edema e eritema observados no envenenamento por aranha marrom durante a manifestação cutânea (DESAI *et al.*, 2000).

O veneno possui efeito deletério sobre o endotélio, removendo constituintes como proteoglicanas e entactina, componentes envolvidos na adesão de células endoteliais e na organização da matriz extracelular sub-endotelial (VEIGA *et al.*, 2001). O desenvolvimento de necroses na pele depende da presença de leucócitos polimorfonucleares e do sistema complemento, que são ativados pela interação das fosfolipases com a membrana celular (CUNHA *et al.*, 2003). Em um estudo em que foi utilizada apenas a fosfolipase D isoladas e purificadas, foi comprovado que somente ela é capaz de proporcionar o influxo de neutrófilos e desta forma promover a dissociação das fibras de colágeno na derme (TAMBOURGI *et al.*, 1998). DOMINGOS *et al.* (2003) também demonstraram a importância das fosfolipases nos processos de proliferação e migração de neutrófilos, bem como na liberação de citocinas. Estes dados revelam que essas proteínas são as principais responsáveis pelos sinais e sintomas do loxoscelismo cutâneo (TAMBOURGI *et al.*, 2005).

Como o desenvolvimento do loxoscelismo depende da ação combinada de várias toxinas, outras contribuem para o aparecimento da doença como a enzima hialuronidase, a qual é responsável pela propagação e aumento da gravidade da lesão na pele (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004), ou seja, pelo espalhamento gravitacional da lesão. Ainda, o conteúdo gástrico das *Loxosceles* é composto por proteases, capazes de clivar colágeno, gelatinases, fibronectina, fibrina e elastina. Esse conteúdo gástrico é capaz de induzir necrose em modelos de coelhos, não causando ulcerações na pele, mas há uma associação dos componentes gástricos com as fosfolipases, aumentando a atividade do veneno (SWANSON & VETTER, 2006).

Histopatologicamente, as lesões necróticas são caracterizadas pelo acúmulo de polimorfonucleares dentro e ao redor das veias, e pelo extravasamento de hemácias ao redor dos vasos, sugerindo uma perda da integridade vascular e dos mecanismos de coagulação extravascular (VEIGA *et al.*, 2001; OSPEDALL *et al.*, 2002).

2.2.2 *Loxoscelismo Sistêmico ou Víscero-cutâneo (LVC)*

O loxoscelismo sistêmico é menos comum que a forma cutânea, no entanto, é a principal causa de óbitos (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A descrição de casos letais de pacientes acometidos por LVC é mais comum em crianças, principalmente até sete anos (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; LUNG & MALLORY, 2000), em pacientes diabéticos e imunodeprimidos. Eles revelam a presença de polipnéia, emese, palidez, icterícia, oligúria, hemoglobinúria, diarreia, vômitos, coagulopatias, petéquias e acidose metabólica severa (ZAMBRANO *et al.*, 2005). Sinais e sintomas como fraqueza, febre, náuseas, vômito e convulsões, sugerem que também há efeitos do veneno sobre o sistema nervoso central (FUTRELL, 1992).

O desenvolvimento do loxoscelismo sistêmico pode ocorrer 24 a 72 horas após o envenenamento e os sinais e sintomas variam de acordo com a susceptibilidade do indivíduo (TAMBOURGI *et al.*, 1998) e devido a algumas características como a idade da aranha e do paciente (MALAQUE *et al.*, 2002), além de outros fatores já descritos. Nas primeiras 24 horas após a picada podem surgir sintomas do quadro cutâneo-visceral que incluem astenia, febre, emese, cefaléia, alterações sensoriais, insônia e coma. As manifestações de maior gravidade incluem alterações hematológicas caracterizadas por anemia hemolítica, agregação plaquetária e, por consequência, trombocitopenia seguida de coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal (CHAIM *et al.*, 2005), que são as causas principais de óbito (HOGAN, BARBARO & WINKEL, 2004).

Deposição do componente C3 do complemento foi detectada ao redor de vasos sanguíneos 1 a 2 horas após a inoculação do veneno em camundongos (TAMBOURGI *et al.*, 2005). O veneno da *Loxosceles intermedia* induz à ativação de metaloproteínases endógenas resultando na clivagem de glicoforinas da superfície dos eritrócitos, fazendo com que a célula fique mais susceptível à ativação da via alternativa do complemento (TAMBOURGI *et al.*, 2000; PEDROSA *et al.* 2002, SWANSON & VETTER, 2006). As fosfolipases D presentes no veneno degradam componentes dos eritrócitos diretamente, causando hemólise, a qual também ocorre pelo acúmulo de leucócitos polimorfonucleares que ativam o complemento e, ainda, possuem ação direta sobre as plaquetas causando a agregação das mesmas

(TAMBOURGI *et al.*, 2000). A ativação da via clássica do complemento também é um achado, que ocorre por meio da ação das toxinas sobre as metaloproteínas endógenas na superfície da membrana (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

DA SILVA *et al.*, (2003) registraram alterações hematológicas decorrentes do loxoscelismo, como a diminuição no número de eritrócitos após 10 dias de administração de veneno em coelhos, além de depressão de megacariócitos no sangue periférico no início do envenenamento, correlacionando esse evento com a trombocitopenia observada. Num estudo “in vitro”, o veneno provocou agregação plaquetária e trombocitopenia, provocada pela fosfolipase D, e coagulação intravascular foi observada (FUTRELL, 1992; OSPEDAL *et al.*, 2002). Reação hemolítica tem sido observada em humanos e em eritrócitos suínos, e pode ser caracterizada pela hemoglobinúria, coloração escura da urina, níveis de hemoglobina diminuídos no sangue periférico e aumento dos reticulócitos. Em coelhos, ratos e camundongos essa reação não ocorre, indicando que há uma variação na susceptibilidade animal (DA SILVA *et al.*, 2003). O mesmo acontece com as lesões necróticas que são bem evidentes em humanos e coelhos, mas acabam não se manifestando em camundongos e ratos. A coagulação intravascular, além de ocorrer nos vasos causando oclusão de veias e arteríolas, pode ocorrer nos pulmões, fígado e rins quando o veneno é administrado sistemicamente em animais (HOGAN, BARBARO & WINKEL, 2004).

Nas manifestações víscero-cutâneas, algumas características clínicas e laboratoriais podem ajudar a determinar a presença e a severidade da doença. O envolvimento sistêmico pode ser caracterizado pelo aumento dos níveis de reticulócitos, lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina indireta, transaminases, uréia, creatinina, creatina-quinase e pela diminuição da hemoglobina e do hematócrito, sendo que, clinicamente, a principal característica é a presença de febre e icterícia. Bioquimicamente, a elevação dos níveis de creatinina, bilirrubina, uréia, LDH e transaminases, sugerem alterações renais, que estão bem definidas e comprovadas, e alterações hepáticas, que requerem maiores estudos. Um estudo de dois casos clínicos evidenciou as alterações laboratoriais mais comuns no loxoscelismo sistêmico conforme mostrado na tabela 1.

TABELA 1: TESTES LABORATORIAIS REALIZADOS NA ADMISSÃO DE DOIS PACIENTES COM LOXOSCELISMO SISTÊMICO: 48 HORAS (CASO 1) E 6 HORAS (CASO 2) APÓS O ENVENENAMENTO.

	Caso 1	Caso 2	Valores normais
Hemoglobina (g/dl)	3,9	9,5	12-16
Hematócrito (%)	7,0	24,0	35-47
Leucócitos (mm ³)	32400	58900	5000-10000
Plaquetas (mm ³)	299000	110000	140000-450000
Reticulócitos (%)	4,4	2,2	0,5-1,5
Uréia (mg/dl)	194	72	10-45
Creatinina (mg/dl)	6,4	1,2	0,6-1,4
LDH (U/L)	15317	9158	21-423
AST (U/L)	253	297	10-30
ALT (U/L)	180	98	10-36
Bilirrubina conjugada (mg/dl)	1,6	1,6	Inferior a 0,4
Bilirrubina não conjugada (mg/dl)	6,4	9,5	0,1-0,6

FONTE: FRANÇA; BARBARO; ABDULKADER (2002)

Os pacientes acometidos pelo loxoscelismo podem apresentar efeitos nefrotóxicos, que podem ser o reflexo de distúrbios hematológicos (FRANÇA; BARBARO; ABDULKALDER, 2002; FUTREL, 1992; LUNG & MALLORY, 2000). O efeito hemolítico contribui para a lesão renal devido à presença de hemoglobina livre precipitada ao longo do néfron, a qual poderia retardar o fluxo do fluido tubular produzindo uma resposta patológica representada pela redução da filtração glomerular e desencadeando a insuficiência renal aguda (COUTINHO, 1996). CHAIM *et al.* (2006) demonstraram que o veneno e a toxina recombinante da fosfolipase D, (LiRecDT1) possuem efeito direto sobre a função renal, podendo ocorrer deposição das toxinas do veneno ao longo das estruturas renais, como nas membranas basais, e isto poderia explicar a lesão epitelial celular, hialinose (degeneração hialina do colágeno), proteinúria e o dano nas células tubulares (LUCIANO *et al.*, 2004), comprovando que não ocorrem danos renais somente por consequência da hemólise intravascular. Ainda, o veneno da *L. intermedia* apresenta muitas proteases, que possuem a habilidade de degradar constituintes de membrana, resultando em perda da integridade da membrana basal e como consequência a perda da membrana glomerular. Biópsias renais de camundongos tratados com o veneno da *L. intermedia* revelaram a presença de eritrócitos na

cápsula de Bowman, colapso glomerular, células epiteliais citotóxicas tubulares e deposição de material eosinofílico dentro do lúmen tubular (DA SILVA *et al.*, 2004). Análises histopatológicas evidenciaram que os danos renais em camundongos são dose-dependentes e que há necrose tubular aguda, acompanhada de deposição de material eosinofílico dentro dos túbulos renais distais (TAMBOURGUI *et al.*, 1998). Estes fatores promovem a perda da integridade vascular dos capilares glomerulares (LUCIANO *et al.*, 2004).

A membrana basal glomerular atua como uma barreira seletiva, regulando a filtração tanto em concentração quanto em tamanho de moléculas do plasma que passam para o espaço urinário. Como o veneno pode atuar bloqueando as funções desta membrana, ocorre um bloqueio nos processos de filtração, proteinúria e glicosúria, podendo evoluir para uma diminuição do volume urinário, levando à oligúria e raramente à anúria, e as substâncias que deveriam ser excretadas, como a creatinina, uréia e glicose acabam sendo reabsorvidas e seus níveis séricos aumentados (FUTRELL, 1992; LUNG & MALLORY, 2000, DA SILVA *et al.*, 2004). Por consequência, observa-se um quadro de azotemia, pelo aumento dos níveis de uréia.

As evidências para um possível dano hepático provocado pelo veneno de *Loxosceles* estão baseadas em relatos do aumento dos valores das transaminases para níveis acima de 500 U/L e 1.000 U/L para a alanina-amino-transferase (ALT) e aspartato-amino-transferase (AST), respectivamente (FRANÇA, BARBARO, ABDULKADER, 2002; ZAMBRANO *et al.*, 2005). Elevações exorbitantes de transaminases (≥ 1.000 U/L) ocorrem quase que exclusivamente em danos hepáticos extensos, secundários a tóxicos ou fármacos (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ & PÉREZ-CAMPOS, 2005), e pelas quais se infere que o veneno loxoscélico é indutor de importante hepatopatia. Um estudo recente, o qual avaliou um paciente picado pela aranha do gênero *Loxosceles*, mostrou que esse apresentou entre outras alterações, um aumento significativo das transaminases no primeiro dia após a picada e no quinto dia, as enzimas continuaram elevadas (DE SOUZA *et al.*, 2007).

Um estudo realizado em camundongos, utilizando uma toxina purificada de *L. reclusa*, por BABCOCK *et al.* (1981) mostrou que há definitivamente comprometimento hepático em condições de exposição aguda à toxina, o qual ficou evidente devido às análises séricas realizadas durante sua pesquisa, embora

histologicamente não ocorreram alterações. Esta condição foi demonstrada quando foram analisados os níveis séricos de transaminases, lactato desidrogenase (LDH), sorbitol desidrogenase e isocitrato desidrogenase. Os pesquisadores ainda analisaram as isoenzimas da LDH. Para a LDH 5, que é específica para danos hepáticos, encontraram valores aumentados quando comparados com o do grupo controle, além de obterem valores para LDH total aumentados. A elevação da sorbitol e isocitrato desidrogenase indicou que a toxina tem efeito hepatocelular no citosol e em mitocôndrias. Ainda, a ureagênese ocorre essencialmente em hepatócitos, e há descrição de aumento significativo de uréia plasmática durante o loxoscelismo (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006), o que pode indicar modificação no aporte de aminoácidos neste órgão em função do envenenamento.

Apesar destas premissas, a literatura especializada é carente em dados que correlacionam alterações hepáticas e loxoscelismo.

2.3 Toxina Recombinante

O veneno da aranha marrom possui uma composição altamente complexa, contendo muitas toxinas protéicas. Muitas dessas toxinas têm sido identificadas e caracterizadas bioquimicamente e biologicamente, e incluem: fosfatase alcalina, hialuronidase (DA SILVEIRA *et al.*, 2006), serinoproteases, fosfolipase-D (VEIGA *et al.*, 2000) e metaloproteases.

A fosfolipase-D tem sido denominada como toxina dermonecrótica e é a molécula melhor caracterizada e identificada bioquimicamente dentre todas as citadas, estando presente em diferentes espécies de *Loxosceles*, tais como a *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. rufescens* (DA SILVEIRA *et al.*, 2006). Tanto a molécula de origem nativa quanto a sua variante recombinante podem induzir dermonecrose, agregação plaquetária, hemólise (CUNHA *et al.*, 2003; PEDROSA *et al.*, 2002) e lesões renais (CHAIM *et al.*, 2006). Através do seqüenciamento de clones aleatórios obtidos de uma biblioteca de cDNA, cinco isoformas foram obtidas (LiRecDT1-5 – *Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxin*) (CHAIM *et al.*, 2006; DA SILVEIRA *et al.*, 2007). Através do alinhamento das seqüências aminoacídicas entre as toxinas dermonecróticas LiRecDT1, 2 e 3, foi observada similaridade estrutural mas atividades biológicas diferentes (RIBEIRO, 2007). As

isoformas LiRecDT1 e LiRecDT2 apresentaram efeitos tóxicos semelhantes em camundongos e coelhos com relação à agregação plaquetária, lesões dermonecroticas, resposta inflamatória e infiltração de células inflamatórias na derme, mas somente a LiRecDT1 foi testada e associada aos danos renais (CHAIM *et al.*, 2006).

A isoforma LiRecDT3 é indutora de edema, eritema e resposta inflamatória, mas não causou lesão dermonecrotica e causou baixa atividade de agregação plaquetária e ausência de mortalidade em animais (RIBEIRO, 2007). As isoformas LiRecDT4 e LiRecDT5 demonstraram resposta inflamatória na derme de coelhos e aumento na permeabilidade vascular, no entanto, estas isoformas não causaram a morte de camundongos (DA SILVEIRA *et al.*, 2006), ao contrário do que ocorreu com a LiRecDT1 e 2. Até o presente momento, as isoformas LiRecDT4 e LiRecDT5 não foram testadas para comprovação de efeitos renais, mas está em fase de testes a isoforma LiRecDT6, que causou um grande número de mortes em camundongos e está sendo avaliada para constatação de efeitos renais e dermonecroticos.

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos do veneno e da toxina recombinante dermonecrotica (LiRecDT1) de *Loxosceles intermedia* em fígado de rato.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a interferência do veneno e da toxina recombinante LiRecDT1 nas análises plasmáticas e em vias metabólicas básicas, tais como a glicogenólise, glicólise, neoglicogênese, ureagênese e consumo de oxigênio.
- Investigar se o veneno e as toxinas induzem alterações morfológicas no fígado, por meio de análises histopatológicas.
- Investigar e comparar a hepatotoxicidade em grupos tratados com o veneno e com a toxina dermonecrotica LiRecDT1.

4. JUSTIFICATIVAS

Em termos metabólicos, o fígado é o principal órgão biotransformador do organismo e que se ajusta às necessidades metabólicas em condições fisiológicas e patológicas, estando intimamente relacionado aos efeitos terapêuticos e tóxicos de muitos fármacos e toxinas. Neste contexto, é importante identificar as modificações metabólicas decorrentes do ajuste do fígado às novas necessidades do organismo resultantes do loxoscelismo. Essas informações são importantes para o conhecimento da cinética e ações do veneno e da toxina no fígado, para a avaliação da interferência de ambos em vias metabólicas hepáticas e para adequação dos procedimentos terapêuticos a serem adotados. Para tanto, um estudo abordando sérias bioquímicas, técnicas histológicas e a técnica de perfusão hepática monovascular em ratos, pois está adequada para estudos de fenômenos de transporte, de transformações e de efeitos metabólicos (BRACHT *et al.*, 2002; ACCO & BRACHT, 2004).

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Extrações do Veneno e Obtenção da Toxina Recombinante

O veneno foi fornecido pelo Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa em Animais Peçonhentos (LIPAPE/ UFPR) e pelo Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI). Os referidos laboratórios detêm a técnica de extração do veneno de exemplares adultos de *Loxosceles intermedia*, através de eletrochoque de 15 volts aplicado ao cefalotórax das aranhas e coletado com micropipeta. Após a extração, o veneno é armazenado em freezer a -70°C , permanecendo nesta condição até seu uso. O fato de o veneno ser obtido por eletrochoque não difere em termos qualitativos e quantitativos de proteínas, de outros métodos, como demonstrado por da SILVEIRA *et al.* (2002).

A toxina LiRecDT1 foi produzida e fornecida pelo laboratório de matriz extracelular intitulado Bioquímica de Proteínas e Biotecnologia de Venenos, do Departamento de Biologia Celular, da Universidade Federal do Paraná, através da técnica descrita por CHAIM *et al.* (2006). Tanto o veneno quanto a toxina ficaram

armazenados em freezer a -70°C em alíquotas pequenas e a quantidade de proteína das alíquotas foi determinada pelo método BRADFORD (1976).

5.2 Animais de Experimentação

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, para anuência dos métodos e concordância segundo os princípios éticos do uso de animais de laboratório estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), recebendo certificado número 159.

Foram utilizados ratos machos, variedade Wistar, pesando entre 180 e 220 g, provenientes dos Biotérios da Universidade Federal do Paraná mantidos em condições ideais de temperatura e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e alimentados *ad libitum* com ração comercial e água filtrada.

5.3 Avaliação dose-resposta de veneno e de toxina

Primeiramente, foram realizadas análises plasmáticas bioquímicas para determinar as quantidades de veneno e toxina que poderiam vir a induzir dano hepático, para posterior realização da histologia, imunofluorescência e da perfusão monovascular. As doses escolhidas para este experimento foram baseadas nas quantidades utilizadas em outros trabalhos (BABCOCK *et al.*, 1981; SILVA *et al.*, 2003; LUCIANO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006), e também tendo como base a quantidade de veneno que é injetado normalmente pela aranha marrom (60 a 100 μg de proteína) durante a picada.

Para tanto, foram utilizados 40 ratos Wistar divididos em dois grupos. Cada grupo foi subdividido em quatro ($n = 5$) sub-grupos, nos quais foram testadas concentrações crescentes de toxina LiRecDT1 e do veneno de *L. intermedia*, conforme tabela abaixo. A via de inoculação utilizada foi a subcutânea, e as quantidades em microlitros foram determinadas conforme a concentração de proteínas contida na toxina e no veneno, sendo que o volume final para os grupos toxina foi de 140 μL , e para os grupos veneno 100 μL , utilizando PBS para a diluição.

TABELA 2: ESQUEMA DE DOSES DE VENENO E DE TOXINA INOCULADOS EM RATOS.

Grupos	Toxina	Veneno	PBS
(n=5)	(<i>L.intermedia</i>)	(<i>L.intermedia</i>)	(diluyente)
1 – Controle	-	-	140µL
2	20 µg	-	qsp 140ml
3	40 µg	-	qsp 140ml
4	80 µg	-	qsp 140µL
5 - Controle	-	-	100 ml
6	-	20 µg	qsp 100µL
7	-	40 µg	qsp 100µL
8	-	80 µg	qsp 100µL

Seis horas após a inoculação, os ratos foram anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹) e o sangue coletado com heparina da veia cava abdominal. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do plasma. As seguintes análises plasmáticas foram realizadas: AST, ALT, LDH total, gama GT, uréia e acetilcolinesterase. A atividade da enzima colinesterase foi avaliada devido ao registro prévio do aumento de sua atividade plasmática após envenenamento por *Loxosceles reclusa* (BABCOCK *et al.*, 1981). Para as análises utilizaram-se kits bioquímicos comerciais, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro. A colinesterase plasmática foi dosada através do método de ELLMAN *et al.* (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1988) e a leitura realizada em espectrofotômetro.

5.4 Análises bioquímicas nos tempos 2, 4, 6 e 12 horas após tratamento com veneno total ou toxina LiRecDT1 na dose de 80 µg (curva tempo-resposta).

Após a determinação da concentração de proteína do veneno e da toxina a ser utilizada, descrita no item 5.3, foi realizado novo ensaio, utilizando apenas a concentração de 80 µg de proteína por animal (n = 5 por grupo), e após 2, 4, 6 e 12 horas os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹) e o sangue coletado e processado como no item anterior, para as mesmas análises bioquímicas. Os fígados foram analisados macroscopicamente e retirados para análises histopatológicas e para a realização da técnica de imunofluorescência.

5.5 Imunofluorescência

As amostras de tecido hepático dos três tratamentos (controle, veneno e LiRecDT1) foram fixadas em paraformaldeído 2% em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Após, o material foi emblocado em Tissue Freezing Médium (Eletron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA) e congelado rapidamente em nitrogênio líquido. Os blocos foram mantidos em freezer a -70 °C até a obtenção dos cortes em criostato, os quais foram fixados em lâminas contendo organosilano. Os anticorpos para a reação primária foram produzidos pelo laboratório de matriz extracelular do Departamento de Biologia Celular da UFPR e o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongos conjugado com fluoresceína foi obtido da Sigma.

Os radicais aldeídicos livres da preparação foram bloqueados com glicina 0,1M por dois minutos. As lâminas foram lavadas com PBS por cinco vezes consecutivas. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos intracelulares, utilizou-se PBS/BSA 1% durante 20 minutos. Foram utilizados anticorpos primários anti-IgG específicos anti-veneno obtidos de coelhos para o grupo tratado com veneno, e anti-LiRecDT1 obtidos de camundongos para o grupo tratado com a toxina. Após a reação primária, as lâminas foram incubadas com os referidos anticorpos secundários conjugados com FITC (Chemical International INC. Temecula, CA, USA) ou Texas Red e centrifugados previamente por 10 minutos a 5000 RPM a 4°C. Após 30 minutos de incubação na ausência de luz, as lâminas foram lavadas com PBS. Após a imunomarcção, os núcleos foram corados com DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindole dicloreto) 0,5 µg/mL diluído em PBS durante um minuto. Na seqüência, as lâminas foram lavadas 20 vezes com PBS e mergulhadas rapidamente em água destilada. As lâminas foram montadas utilizando o Fluormont –G, em meio aquoso.

Como controles da reação foram utilizadas as seguintes variáveis:

- a. Para a verificação da autofluorescência do tecido empregou-se apenas o fixador e o bloqueio dos radicais aldeídicos com a glicina 0,1M, correspondendo ao controle pré-imune.
- b. Para a determinação do controle do imunomarcador, omitiu-se o anticorpo primário, correspondendo ao controle secundário.

Uma solução contendo 2 µg/mL de anticorpo anti-IgG hiper-imune de coelho e

veneno bruto da *L. intermedia* foi preparada, sendo o mesmo procedimento realizado com solução de anticorpo hiper-imune de camundongo para a toxina LirecDT1. Ambas as soluções ficaram uma hora sob homogeneização para a ocorrência da reação. Em seguida, o mesmo protocolo acima foi realizado, sendo esta uma técnica de controle da reação, para garantir que o anticorpo tinha especificidade para o veneno e/ou toxina, e após a ocorrência desta ligação não poderia haver ligação no tecido exposto, neste caso, o fígado. Este ensaio foi realizado para cada hora testada. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência convencional.

5.6 Análise histológica hepática

Cortes transversais do lóbulo direito do fígado foram obtidos e fixados no líquido metacan, composto por 60 mL de metanol, 30 mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético glacial, por três horas. Na sequência, o material foi submetido a banhos consecutivos de etanol absoluto por três vezes durante 30 minutos e permaneceu em repouso por 16 horas em temperatura ambiente no etanol absoluto contendo xilol na mesma proporção. Após as 16 horas, o material sofreu diafanização em xilol três vezes consecutivas durante 30 minutos cada. O material foi então impregnado em parafina líquida por duas horas em estufa, sob temperatura de 58 °C.

Os blocos histológicos foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes com três micras de espessura. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina de Harris (Merck), por 60 segundos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente com água destilada para posterior coloração com eosina (Merck) durante 1 minuto, segundo BEAUTLER *et al.* (1995) e CULLING *et al.* (1985). Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada, desidratadas em solução crescente de etanol (70 a 100%, durante cinco minutos em cada etapa), diafanizadas primeiramente em álcool e xilol (etapa única de cinco minutos) e após somente em xilol (duas etapas a 100%, durante cinco minutos cada). Ao final da preparação, as lâminas foram avaliadas em M.O., no Hospital de Clínicas da UFPR.

5.7 Perfusão monovascular de fígado e avaliação do metabolismo hepático

Para estudo do efeito hepático da toxina LiRecDT1 e do veneno de *L. intermedia* foi utilizada a perfusão monovascular de fígado de rato. Nesta perfusão o vaso eferente (veia porta) e o vaso aferente (veia cava) do órgão são canulados, de tal maneira que o experimentador pode controlar a qualidade do líquido arterial e colher, para posteriores análises, o líquido venoso. (BRACHT; ISHII-IWAMOTO; KELMER-BRACHT, 2002).

O sistema de perfusão disponível foi construído com base no sistema descrito originalmente por SCHOLZ & BÜCHER (1965). Os componentes básicos são a bomba peristáltica, o oxigenador de membrana e a câmara do fígado. A este sistema está ainda acoplado um microeletrodo de platina com polarógrafo, um registrador potenciométrico, um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido e um cilindro contendo a mistura carbogênica. A câmara do fígado, de acrílico transparente, contém um capta-bolhas (dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado), uma câmara para a coleta de amostras e um dispositivo de inserção e fixação do eletrodo de platina. O líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador. Neste local ocorrem, simultaneamente, a oxigenação e o aquecimento para 37°C. O líquido segue para a câmara do fígado, entra no órgão pela veia porta e deixa-o pela veia hepática, sendo colhido pela cânula inserida na veia cava. Após passagem pelo eletrodo de platina e após a coleta de amostras, o líquido remanescente foi coletado para posteriores análises.

O método empregou líquido de perfusão livre de hemoglobina, tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato, cujo pH é igual a 7,4 quando saturado com uma mistura de oxigênio e dióxido de carbono nas proporções 95:5, através do oxigenador de membrana, sendo o fluxo mantido entre 29-30mL/min. A composição salina desse tampão está relacionada na tabela 3.

TABELA 3: COMPOSIÇÃO SALINA DO TAMPÃO KREBS/HENSELEIT-BICARBONATO.

Componente	Concentração (mM)
NaCl	116,0
NaHCO ₃	25,0
KCl	5,9
Na ₂ SO ₄	1,2
MgCl ₂	1,2
NaH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5

A concentração venosa de oxigênio foi mensurada polarograficamente através de um eletrodo de platina combinado com um eletrodo de Ag^o/AgCl (KELMER-BRACHT *et al.*, 1984). As variações na concentração venosa de oxigênio foram registradas e a velocidade de consumo (V_{O_2}) calculada pela fórmula:

$$V_{O_2} = \frac{(C_a - C_v)F}{p}$$

Onde C_v é a concentração venosa de oxigênio ($\mu\text{mol/ml}$) e C_a é a concentração arterial. Esta última é constante e igual a $0,86 \mu\text{mol/mL}$ a 37°C para a concentração salina do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (CLARK, 1956). F é o fluxo através do órgão, em mL/min, e p é o peso úmido do fígado, em gramas.

5.7.1 Perfusão hepática com animais alimentados

Para o experimento de perfusão os animais não sofreram nenhuma restrição alimentar, sendo que a ração ficou à disposição na gaiola até o horário da aplicação subcutânea do veneno ou toxina, que ocorreu logo no início da manhã. Os animais, seis horas após os tratamentos (80 μg veneno, 80 μg de toxina ou PBS) foram anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹) para a retirada do fígado e posicionamento na plataforma de perfusão, conforme o procedimento cirúrgico descrito por KELMER-BRACHT *et al.* (1984) e BRACHT *et al.* (2002). Após a estabilização do fígado na plataforma, conferida pelo consumo de oxigênio venoso, as amostras do

perfusado foram coletadas a cada dois minutos durante 50 minutos. Essas amostras foram mantidas em gelo até o horário da dosagem dos metabólitos: lactato, piruvato e glicose.

5.7.2 Perfusão hepática com animais em jejum

Para este procedimento experimental os animais foram submetidos a jejum de 24 horas. Seis horas após os tratamentos (80µg veneno, 80µg toxina ou PBS), os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg.kg⁻¹) para a realização da perfusão hepática. Após a cirurgia para a remoção do fígado e a estabilização do fígado na plataforma, as amostras do perfusado foram coletadas a cada dois minutos até 60 minutos. No 10º minuto, o líquido de perfusão foi acrescido de alanina 2,5 µM. As amostras do perfusado hepático foram mantidas em gelo até o horário das dosagens dos metabólitos: piruvato, lactato, glicose, amônia e uréia.

5.8 Dosagem de metabólitos do perfusado hepático

Os experimentos de perfusão tiveram o objetivo de avaliar diversas vias metabólicas, tais como: glicólise, neoglicogênese, glicogenólise, ureagênese, amoniogênese e consumo de oxigênio. Para esta avaliação, a lactato desidrogenase foi utilizada para dosar lactato e piruvato, através de método espectrofotométrico, com medidas de variações na concentração de NADH a 340 nm (GUTMANN & WAHLEFELD, 1974; CZOK & LAMPRECHT). Para as dosagens de uréia e amônia, empregou-se as enzimas GLDH e a urease segundo BERGMEYER (1974) e KUN & KEARNEY (1974), e a glicose foi dosada segundo BERGMEYER & BERNT (1974).

5.9 Dosagem do Glicogênio Hepático

A dosagem de glicogênio foi realizada segundo KEPLER & DECKER (1974) em animais alimentados, os quais receberam por via subcutânea 80µg de veneno ou PBS, 6 horas antes da dosagem.

5.10 *Análise Estatística dos Dados*

Os dados foram analisados quanto à homogeneidade da variância e à normalidade da distribuição. Para os dados paramétricos foi utilizado o teste ANOVA para comparar as variáveis dependentes entre os grupos experimentais e o controle nas diferentes concentrações de proteína. Como Post Hoc, utilizou-se o teste de Tukey. Para as comparações dos grupos controle, veneno e toxina nas diferentes horas utilizou-se ANOVA de duas vias seguida de Tukey. Para as demais comparações utilizou-se ANOVA de uma via seguido de Tukey. Os resultados obtidos da dosagem de glicogênio, foram analisados através do Teste T Student. O programa estatístico utilizado foi o Statistica 5.5 e Graph Pad Prism 4.0. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação dose-resposta de veneno e de toxina LiRecDT1

O grupo tratado com o veneno apresentou diferença estatística principalmente em comparação ao controle para as principais enzimas hepáticas. A dosagem da AST ($F(3-16) = 6,306$; $p=0,005$) mostrou diferença estatística entre o grupo 80 μ g e todos os outros ($p=0,02$), sendo que para a ALT ($F(3-15) = 4,109$; $p=0,025$), a única diferença foi entre o grupo 80 e o controle ($p=0,031$). A gama GT ($F(3-15) = 278,6$; $p=0,00001$) do grupo 80 μ g foi diferente estatisticamente do controle e de todos os outros grupos tratados. Na dosagem de LDH houve diferença estatística entre o grupo veneno 80 μ g e o grupo controle ($F(3-16) = 3,408$; $p = 0,04$). A atividade da acetilcolinesterase e a dosagem de uréia não apresentaram diferença estatística. Estes resultados bioquímicos estão mostrados na figura 05.

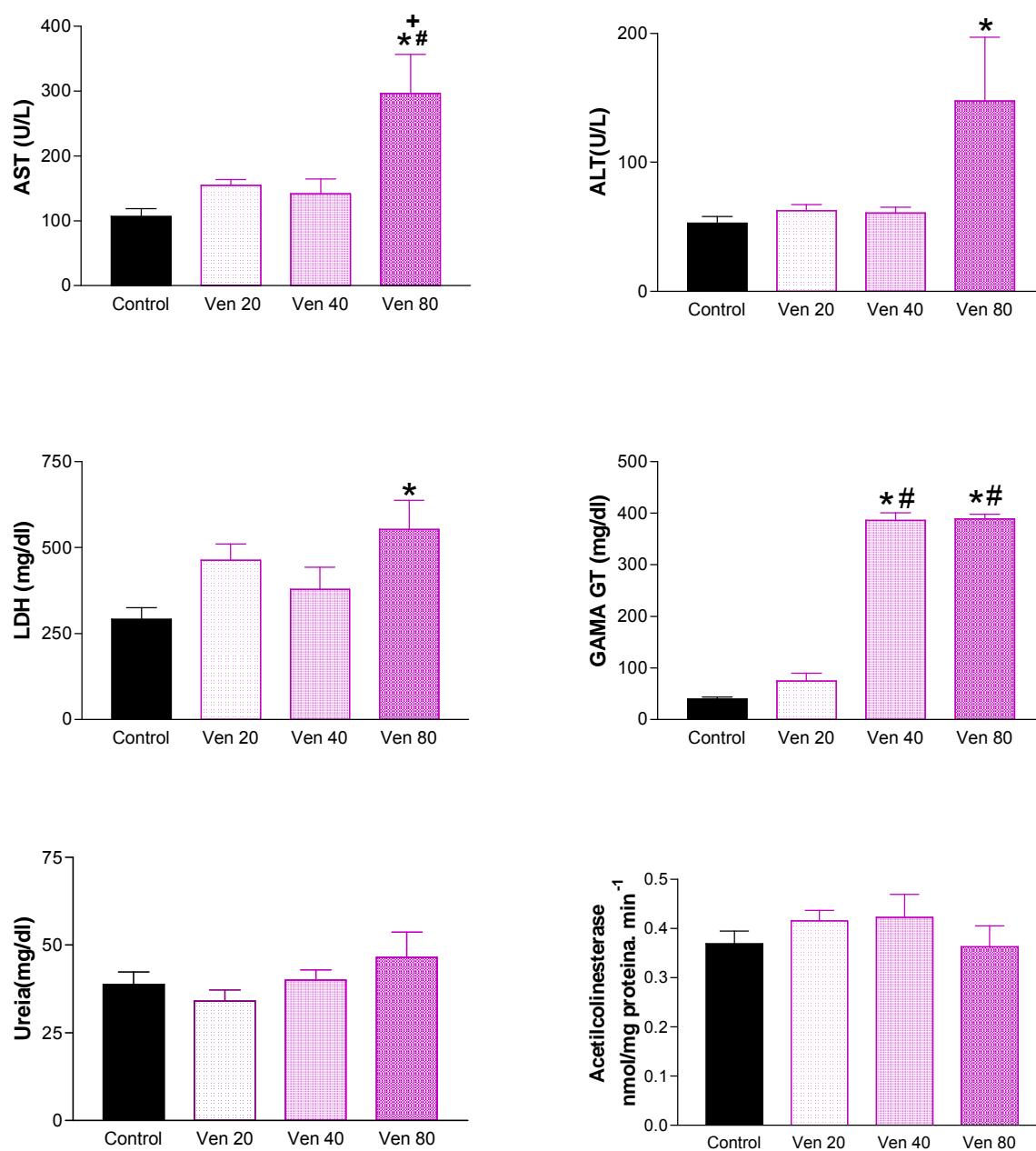


FIGURA 05: Análises bioquímicas plasmáticas realizadas em sangue periférico de ratos tratados com veneno de *Loxosceles intermedia*. As barras expressam média \pm erro padrão da média. Utilizada ANOVA de uma via seguida de Tukey (n=5). *difere do controle, # difere de Ven 20 μ g, + difere de Ven 40 μ g, (p<0,05).

Para o grupo tratado com a toxina LiRecDT1 (FIGURA 06), a única dosagem bioquímica que apresentou diferença estatística foi a ALT ($F(3,15) = 3,681$; $P=0,0036$).

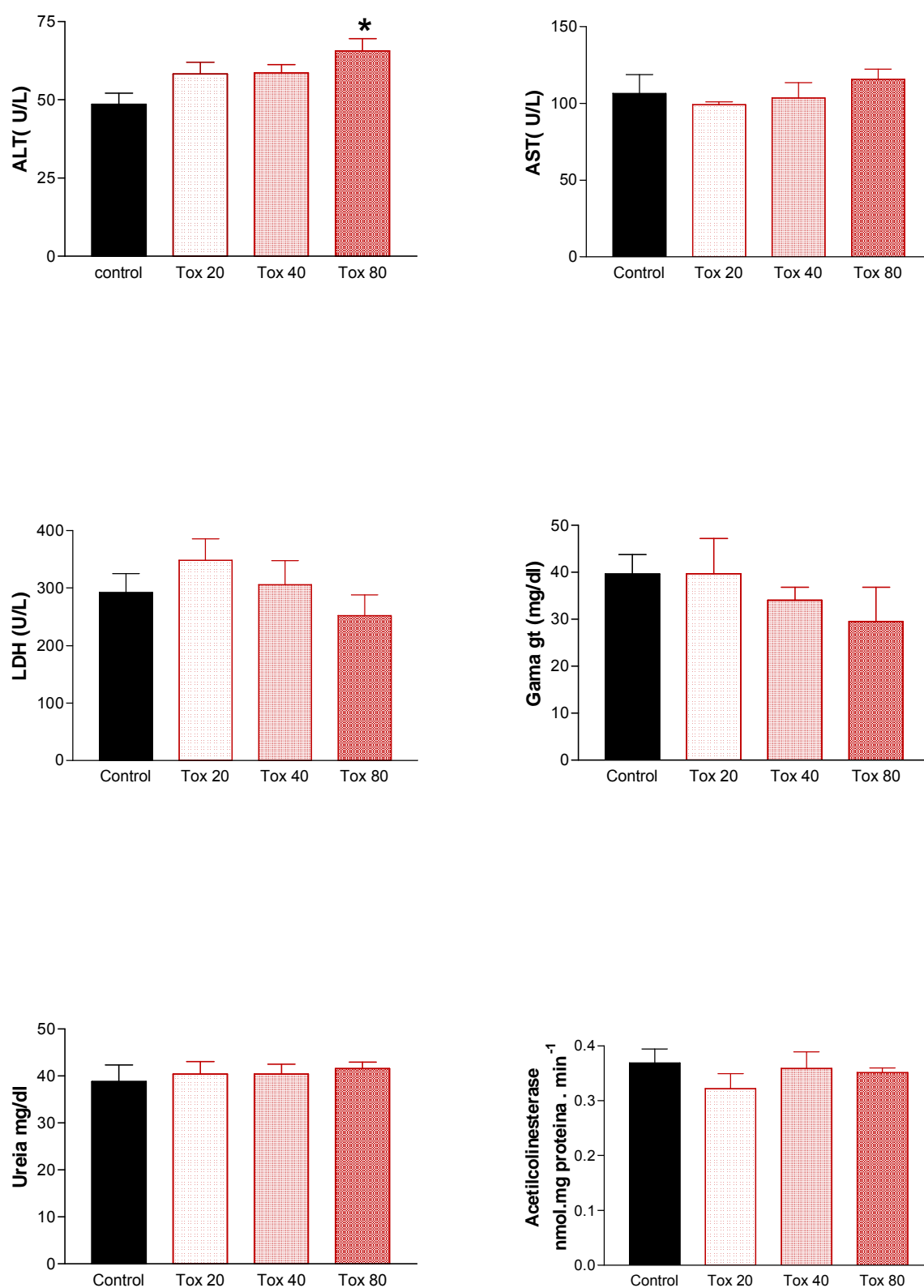


FIGURA 06: Análises bioquímicas plasmáticas realizadas em sangue periférico de ratos tratados com Toxina dermonecrotica recombinante de *Loxosceles intermedia* (LiRecDT1). As barras expressam média ± erro padrão da média. Utilizada ANOVA de uma via seguido de Tukey (n=5).
* difere do controle (p<0,05).

6.2 Análises bioquímicas tempo-resposta com veneno total ou toxina LiRecDT1

Foi construída uma curva tempo-resposta para os parâmetros bioquímicos plasmáticos tanto para o veneno quanto para a toxina LiRecDT1, nos tempos 2, 4, 6 e 12 horas, que estão expressos na figura 07.

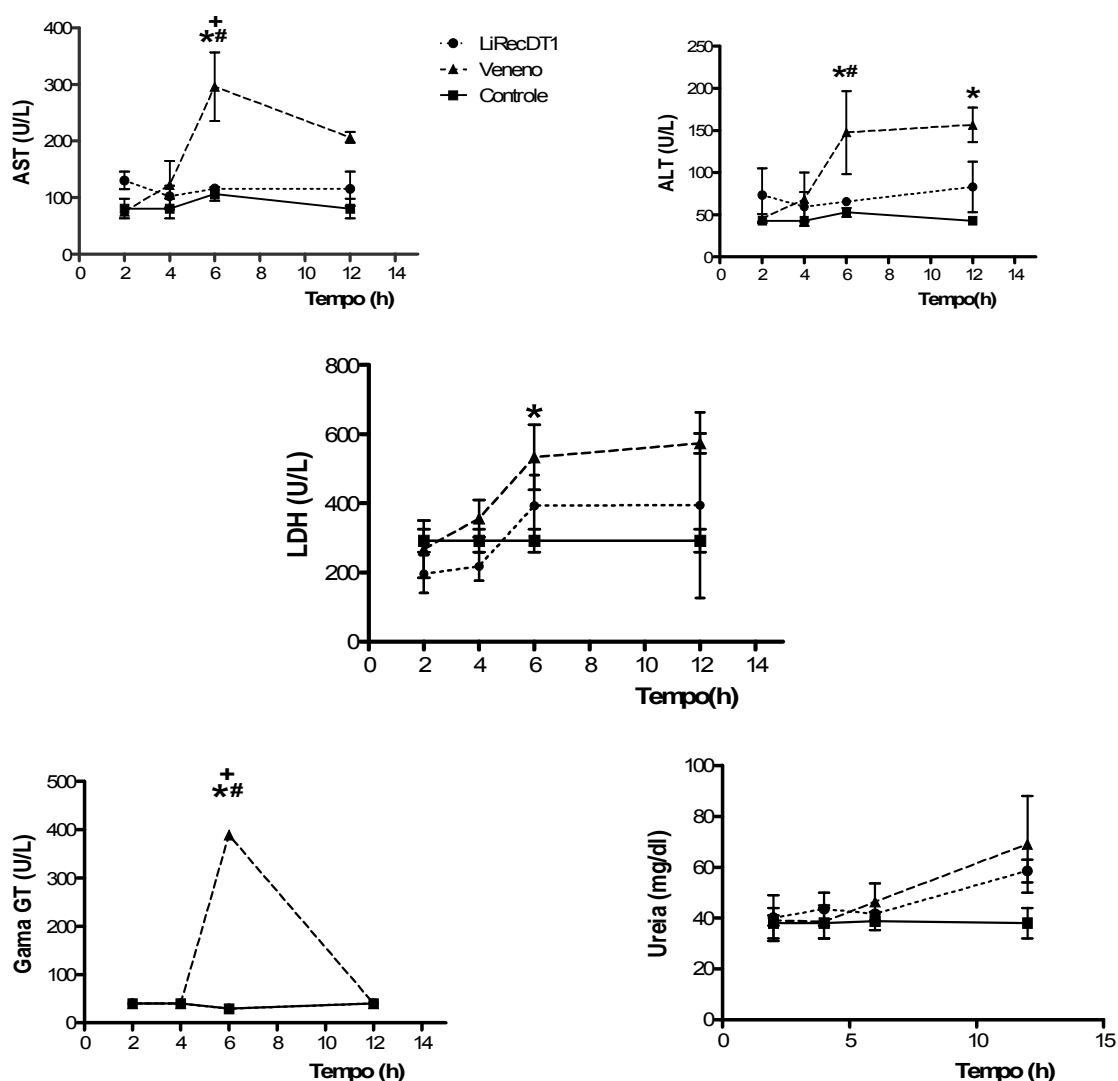


FIGURA 07: Curva bioquímica plasmática de tempo-resposta em ratos Wistar (n=5) tratados com veneno bruto (80µg), toxina LiRecDT1(80µg), ou PBS. As barras expressam a média ± erro-padrão da média. ANOVA de duas vias seguida de Tukey. * Difere do controle na mesma hora; # difere do tratamento toxina na mesma hora; + difere do mesmo tratamento em horários diferentes (para AST = Ven 6 h difere do Ven 2 h e Gama GT Ven 6 h difere de Ven 2, 4 e 12 h), (p<0,05).

Para a dosagem plasmática da AST, houve diferença estatística entre os grupos ($F(2,21) = 4,62$; $p=0,021$) e entre a hora ($F(3,21) = 3,03$; $p=0,05$). A interação entre grupo e hora não foi diferente estatisticamente, sendo $F(6,21)=2,22$ e $p=0,08$.

Analisando os resultados do *post hoc*, ocorreu um aumento da enzima em 6 horas, como encontrado anteriormente, sendo que mais uma vez, o grupo veneno 6 horas também foi diferente estatisticamente do grupo toxina na mesma hora ($p=0,008$) e do grupo controle ($p= 0,005$).

Para a ALT, houve diferença apenas dentro do grupo ($F(2,21) =4,80$; $p=0,019$). Pode-se perceber apenas diferença estatística entre o grupo controle e o veneno em 6 e 12 horas, sendo os valores de p respectivamente iguais a 0,042 e 0,05.

A análise plasmática da LDH apresentou uma diferença estatística em relação ao grupo ($F(2,30) = 3,883$; $p= 0,04$) e à hora ($F(3-30) = 4,957$; $p= 0,001$). Não houve diferença na interação grupo e hora. Após o *post hoc*, apenas o grupo veneno em 6 horas, diferiu estatisticamente do grupo controle na mesma hora ($p=0,04$). No entanto, em 12 horas, a LDH permaneceu aumentada sob efeito do veneno, mas esta não foi diferente estatisticamente, provavelmente devido ao erro padrão estar alto do grupo.

Para a enzima Gama GT, houve diferença estatística entre os grupos ($F(2,21) =164,84$; $p=0,0000$), entre a hora ($F(3-21) = 220,07$; $p=0,0000$) e na interação entre grupo e hora ($F(6-21)=254,75$; $p=0,0000$). Após o teste de Tukey, pode-se verificar diferenças entre o grupo tratado com o veneno bruto após 6 horas em todas as outras horas ($p=0,0001$) e entre o controle e toxina LiRecDT1 na mesma hora ($p=0,0001$), como obtido anteriormente, confirmando que o veneno bruto promove um aumento das principais enzimas hepáticas, sendo a maior elevação em 6 horas.

6.3 Imunofluorescência

O tecido hepático foi examinado por reações de imunofluorescência utilizando IgG hiperimune purificada, a qual reage com as toxinas presentes no veneno bruto e com a toxina LiRecDT1, em amostras hepáticas de ratos tratados. A figura 08 mostra a reação negativa para o fígado sem tratamento.

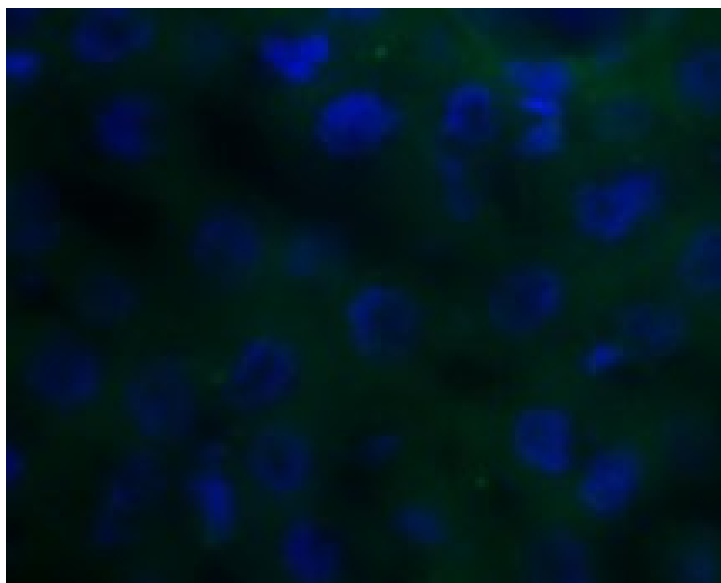


FIGURA 08 – Imunofluorescência analisada em microscópio de fluorescência convencional. Fígado de rato controle – não tratado. Imagem com ausência de fluorescência, indicando reação negativa específica para a sua marcação. Núcleo corado com DAPI.

Na figura 09 estão representados os fígados tratados com veneno bruto e coletados após 2 e 4 horas, negativos para a reação.

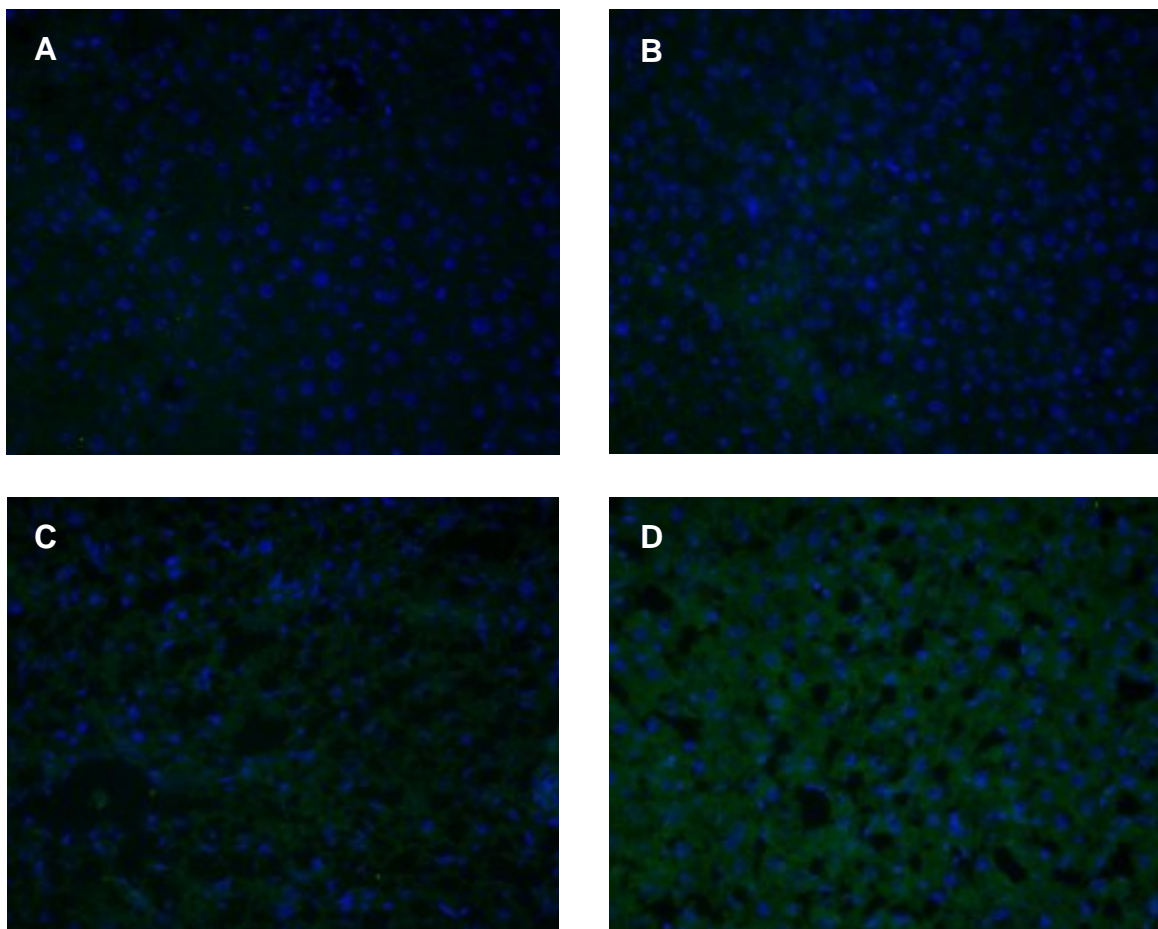


FIGURA 09 – Imunofluorescência analisada em microscópio de fluorescência convencional. Fígado de ratos tratados com o veneno de *Loxosceles intermedia* (80µg). A figura A e C representam o controle da competição utilizando antígeno e anticorpo em solução para a comprovação da ligação específica entre o antígeno e o anticorpo; B e D representam os testes, sendo B, fígado coletado após 2 horas e D após 4 horas, indicando a ausência de fluorescência, portanto, negativos para a marcação específica. Núcleo corado com DAPI.

A interação do anticorpo IgG contra o veneno em amostras de fígado expostos ao veneno bruto ocorreu em 6 e 12 horas (FIGURA 10).

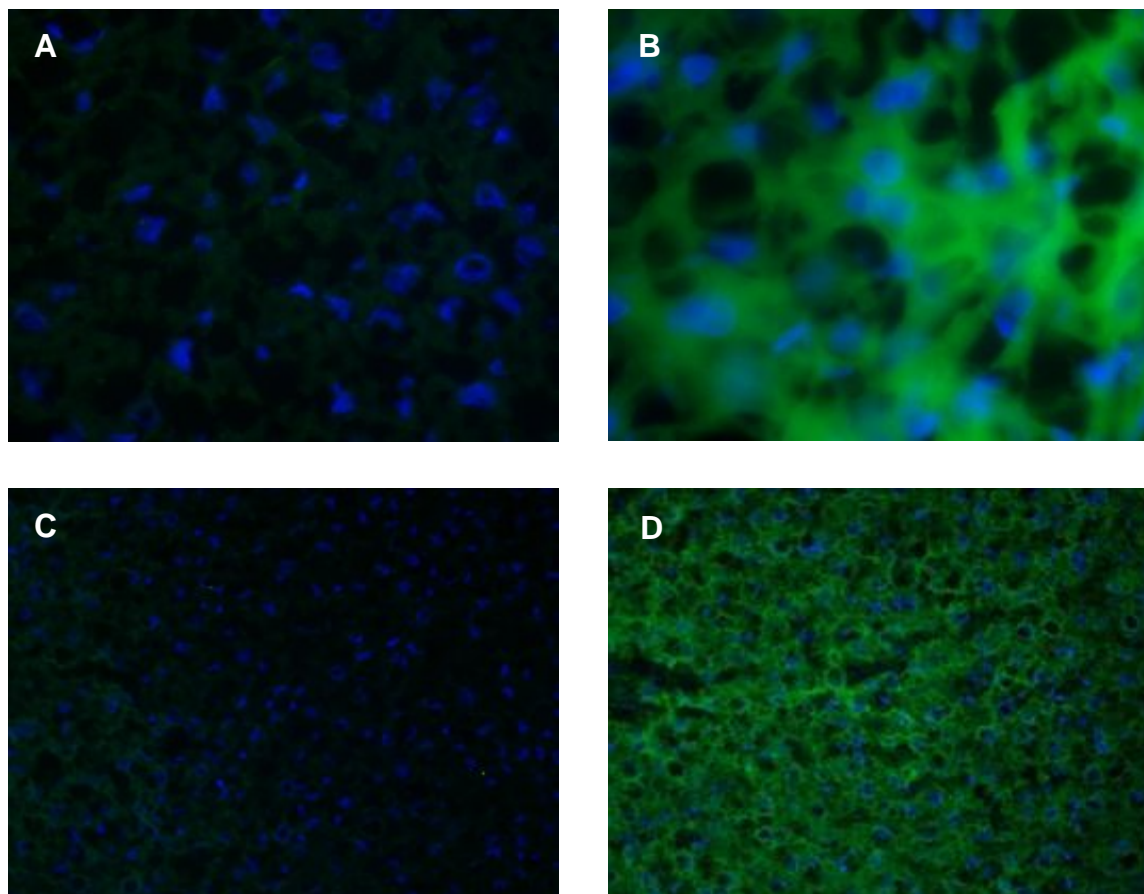


FIGURA 10 – Imunofluorescência analisada por microscopia de fluorescência convencional. Fígado de ratos tratados com o veneno de *Loxosceles intermedia* (80µg). A e C representam o controle do ensaio da competição utilizando antígeno e anticorpo em solução. As figuras B e D representam fígado de animal tratado com o veneno, positivo à marcação com o anticorpo conjugado com FITC em animais tratados e fígados coletados após 6 e 12 horas, respectivamente. Núcleo corado com DAPI.

Em relação aos animais tratados com a toxina LiRecDT1, os fígados retirados após duas e quatro horas também foram negativos para a marcação (FIGURA 11). Assim como no grupo veneno, também foram realizados os ensaios de competição. Neste caso, o anticorpo foi incubado previamente com a toxina LiRecDT1, e após, esta solução foi testada no tecido hepático exposto à LiRecDT1. Este ensaio demonstrou uma reação de imunofluorescência inespecífica, que pode ser desconsiderada.

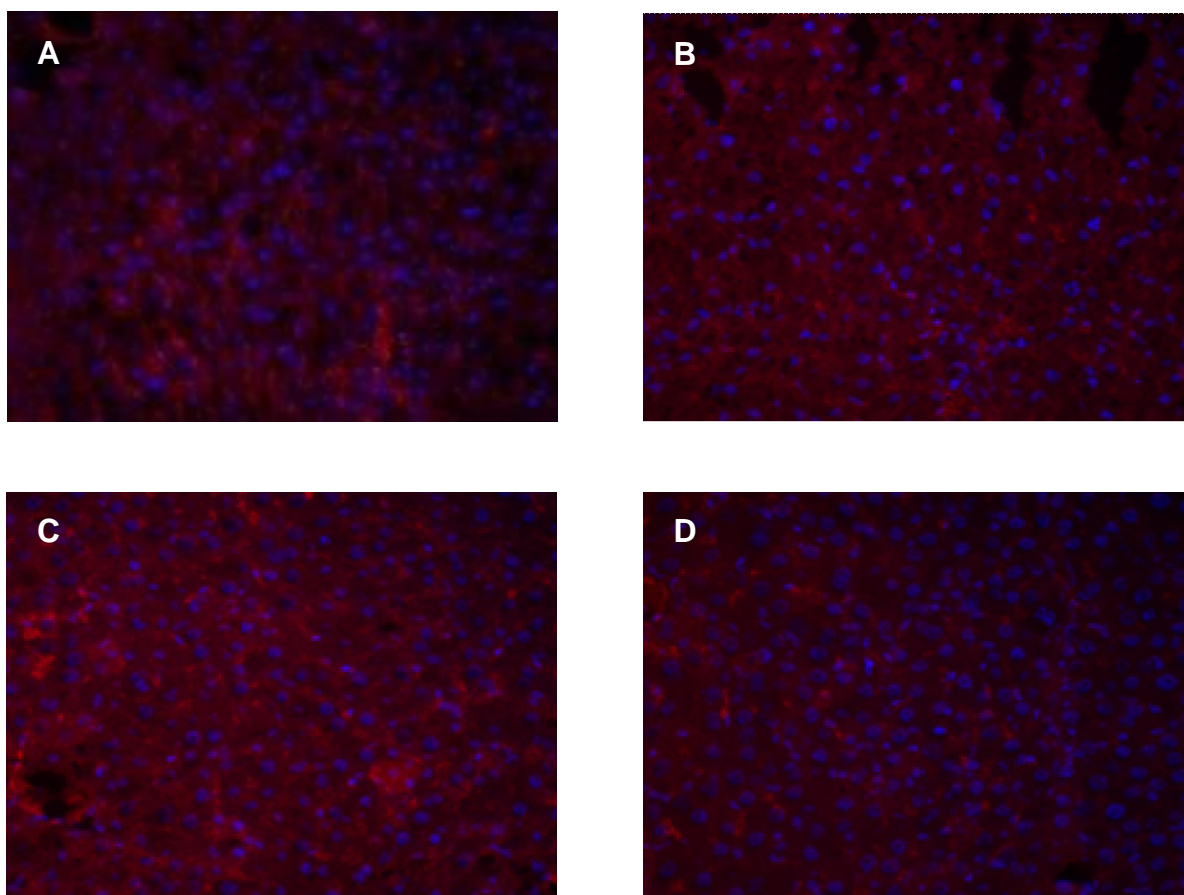


FIGURA 11 – Imunofluorescência analisada por microscopia de fluorescência convencional. Fígado de ratos tratados com a toxina LiRecDT1 de *Loxosceles intermedia* (80µg) coletado após 2 (A e B) e 4 horas (C e D). A e C mostram a reação de competição utilizando antígeno e anticorpo contra a LiRecDT1 em solução; B e D representam os fígados dos animais tratados com a toxina negativos à reação.

Os fígados retirados após 6 horas de tratamento, foram positivos para a reação, indicando que o anticorpo reagiu com a toxina LiRecDT1 presente nas amostras de fígado, bem como ocorreu com o veneno bruto. As fotos estão presentes na figura a seguir:

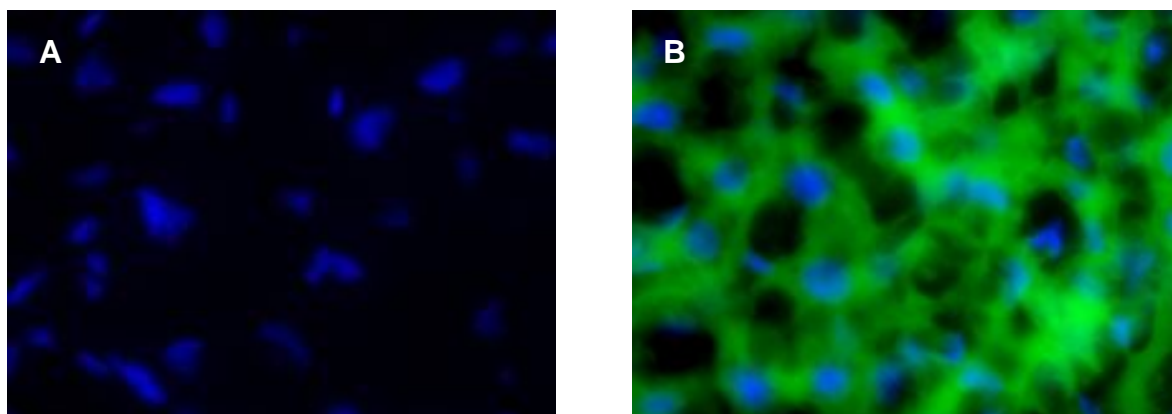


FIGURA 12 – Imunofluorescência analisada por microscopia de fluorescência convencional I sobre o tecido hepático de ratos expostos à toxina LiRecDT1 coletado após 6 horas de tratamento. “A” representa a reação de competição utilizando antígeno e anticorpo em solução, e “B”, positivo à ligação do anticorpo conjugado com FITC, com a respectiva toxina.

O mesmo ocorreu após 12 horas de exposição. Portanto, nesta hora, a toxina permaneceu ligada ao tecido hepático, como mostra a figura 13.

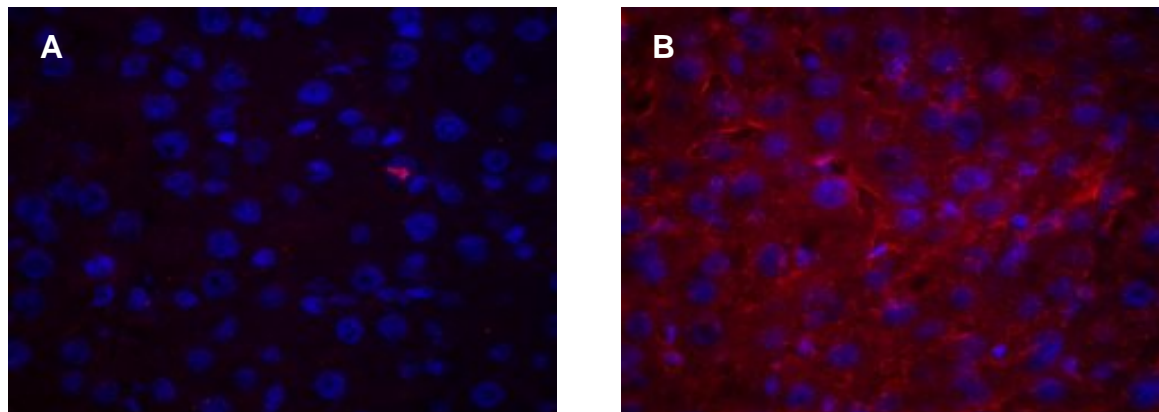


FIGURA 13 – Imunofluorescência analisada por microscopia de fluorescência convencional sobre o tecido hepático de ratos expostos à toxina LiRecDT1 coletado após 12 horas. “A” representa a reação de competição utilizando antígeno e anticorpo em solução e “B” o fígado do animal tratado com a toxina positivo à ligação do anticorpo conjugado com Texas Red com a respectiva toxina.

6.4 Análise histológica hepática

6.4.1. Grupo Veneno bruto de *Loxosceles intermedia*

Macroscopicamente, os fígados tratados com o veneno bruto (80µg) e coletados após 6 horas, apresentaram descoloração perceptível de todas as vísceras, incluindo o fígado. Microscopicamente, foram encontradas várias alterações indicativas de lesão hepática, as quais foram proporcionais ao tempo de exposição ao veneno. O grupo controle apresentou hepatócitos normais e nenhuma alteração inespecífica foi encontrada. Após duas horas da administração subcutânea do veneno, uma discreta migração de leucócitos mononucleares foi encontrada, e após 4 horas aumentou, somada à presença de halo perinuclear no citoplasma dos hepatócitos. Os danos hepáticos mais expressivos foram encontrados nas lâminas de fígado tratados com o veneno e coletados após 6 horas. Neste horário as lâminas mostraram a presença de células apoptóticas e migração de leucócitos mono e polimorfonucleares, incluindo a formação de microabcessos. Também foram verificadas alterações inespecíficas, como a presença de corpúsculos eosinofílicos, presença moderada de células mitóticas, neutrófilos em sinusóides e hepatócitos

com tumefação e hepatocitólise, conforme a tabela 4 e a figura 14.

Após 12 horas a infiltração de leucócitos diminuiu, bem como todas as outras alterações encontradas. Ainda algumas áreas de hepatocitólise em menor grau e halo perinuclear, foram encontradas. O único achado inespecífico, considerado muito proeminente foi a presença de esteatose microgoticular.

TABELA 4: ALTERAÇÕES AVALIADAS EM LÂMINAS DE FÍGADO DE RATOS 2, 4, 6 E 12 h APÓS A INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA DE VENENO BRUTO DE *L. intermedia* (80µg) OU PBS (CONTROLE).

ALTERAÇÕES	TRATAMENTOS (horas)				
	Control	Ven 2	Ven 4	Ven 6	Ven 12
Tumefação	-	-	-	+	
Esteatose microgoticular	-	-	-	-	+
Apoptose	-	+	-	+++	+
Infiltrado portal mononuclear	-	+	-	-	-
Infiltrado portal polimorfonuclear	-	-	-	-	-
Infiltrado lobular mononuclear	-	+	++	+++	+
Infiltrado lobular polimorfonuclear	-	-	-	+++	+
Microabsessos de neutrófilos	-	-	-	+	-
Halo perinuclear	-	-	+	-	-
Mitose	-	-	-	++	-
Hepatocitólise	-	-	-	++	-

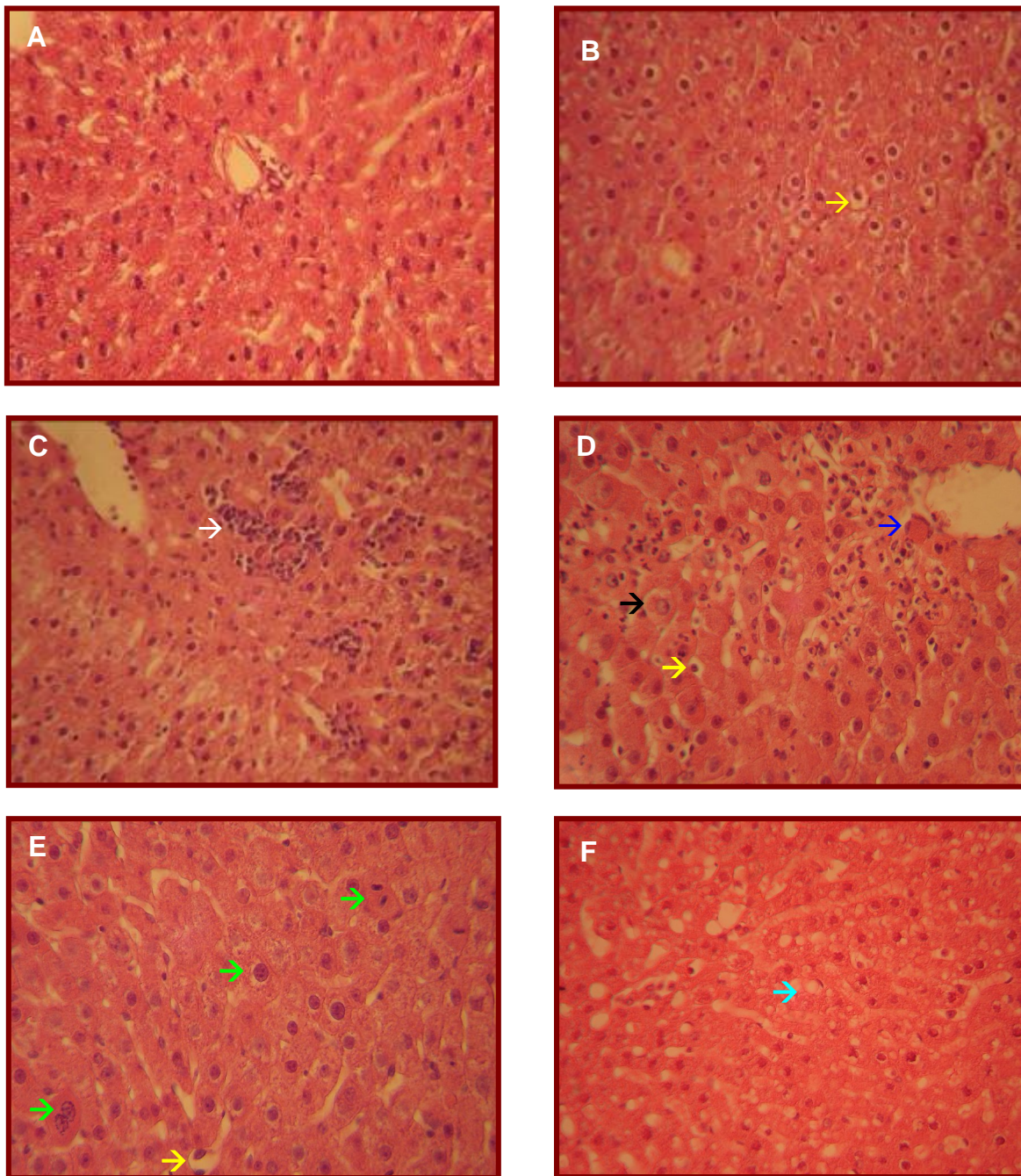


FIGURA 14: Lâminas de fígado de ratos tratados com veneno de *Loxosceles intermedia*, corados com hematoxilina e eosina. A = Grupo Controle apresentando hepatócitos normais e ausência de infiltrado de leucócitos; B = Fígado coletado após 4 h; C, D e E = Coleta após 6 h; F= Coleta após 12 h. Seta branca indica presença de microabscessos de leucócitos mono e polimorfonucleares; → hepatocitólise; → tumefação; → células em mitose; → célula apoptótica; → esteatose.

6.3.2. Grupo Toxina LiRecDT1

O grupo toxina LiRecDT1, após duas horas, apresentou hepatócitos normais, no entanto, com discreto infiltrado de leucócitos mononucleares na região lobular e perivenular, o que também ocorreu no mesmo grupo após quatro horas, sendo que em duas e quatro horas, os hepatócitos apresentaram baixo grau de dissociação entre os espaços portais maiores e a presença de halo perinuclear. Após 6 horas da injeção subcutânea da toxina LiRecDT1 ocorreu um aumento significativo de leucócitos para a região lobular. Os leucócitos presentes eram, em sua maioria, monomorfonucleares. Também ocorreu o aparecimento de alterações inespecíficas, como a eosinofilia no citoplasma das células hepáticas e a presença moderada de células apoptóticas. Após 12 horas, a alteração inespecífica presente foi a hepatocitólise em grau moderado (++). Já o infiltrado de leucócitos monomorfonucleares na região lobular passou de abundante para moderado. Regiões com discretas áreas de necrose foram encontradas. As principais alterações encontram-se na tabela 5 e na figura 15.

TABELA 5: ALTERAÇÕES AVALIADAS EM LÂMINAS DE FÍGADO DE RATOS 2, 4, 6 E 12 h APÓS A INOCULAÇÃO SUBCUTÂNEA DE TOXINA LiRecDT1 DE *L. intermedia* (80µg) OU PBS (CONTROLE).

ALTERAÇÕES	TRATAMENTOS (horas)				
	Controle	Tox 2	Tox 4	Tox 6	Tox 12
Tumefação	-	-	-	-	-
Esteatose microgoticular	-	-	-	-	-
Apoptose	-	+	+	+++	+
Infiltrado portal mononuclear	-	-	-	-	-
Infiltrado portal polimorfonuclear	-	-	-	-	-
Infiltrado lobular mononuclear	-	+	+	+++	++
Infiltrado lobular polimorfonuclear	-	-	-	-	-
Microabscessos neutrófilos	-	-	-	-	-
Fibrose	-	-	-	-	-
Halo perinuclear	-	+	+	++	-
Dissociação de espaços portais	-	+	+	-	-
Hepatocitólise	-	-	-	-	++
Mitose	-	-	-	-	-

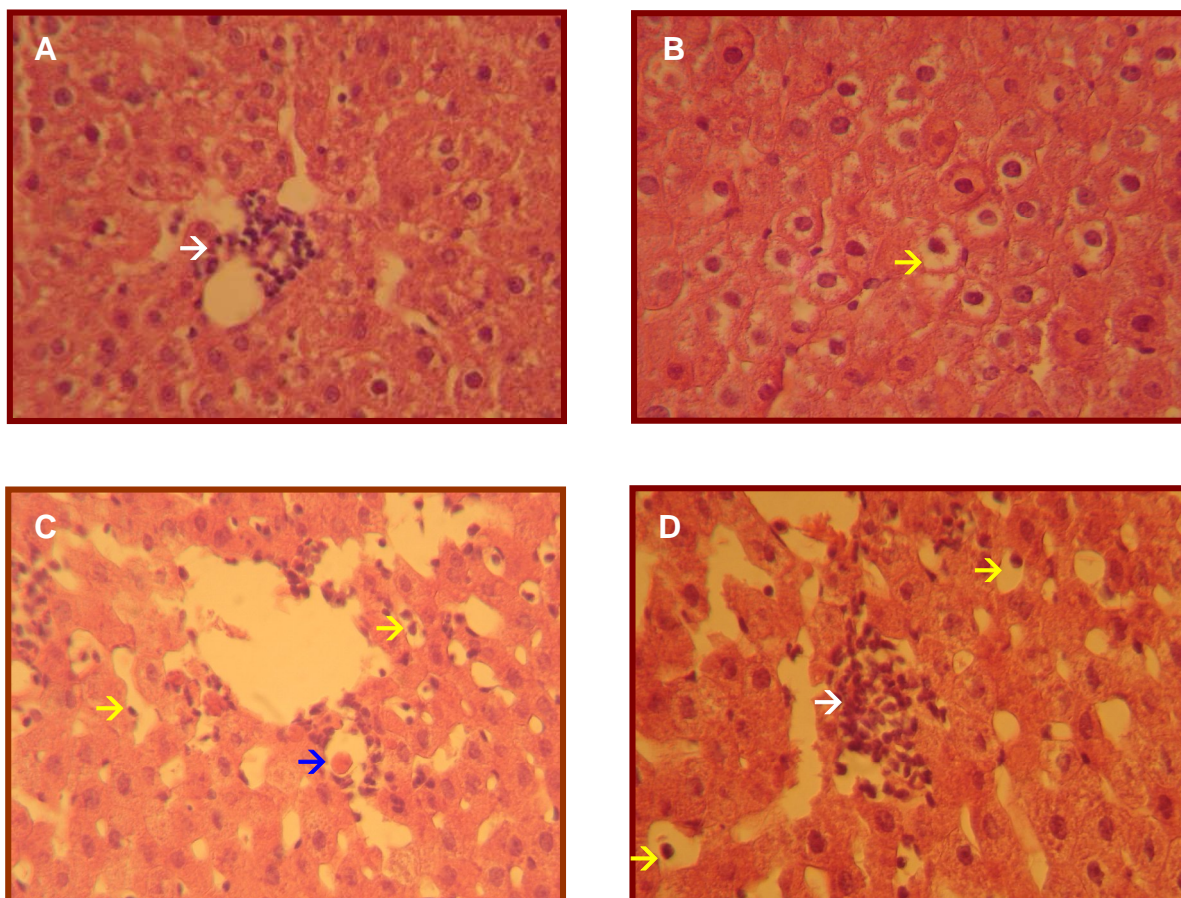


FIGURA 15: Lâminas de fígado de ratos tratados com LiRecDT1. A: Coleta após 4 h apresentando discreto infiltrado leucocitário. B e C: coleta após 6, D: coleta após 12 h. Migração leucocitária presente identificada pela seta branca (MNC); → hepatocitolise ; → célula apoptótica. Aumento de 40X.

6.5 Perfusão monovascular em fígado e metabólitos de ratos expostos ao veneno ou toxina.

6.5.1 Animais alimentados tratados com o veneno, toxina ou PBS.

O veneno bruto foi capaz de alterar a produção de glicose após 6 horas de tratamento sendo $F(2,12)=6,36$ e $p=0,02$; fato que não ocorreu com os animais tratados com a toxina, embora, a LiRecDT1 foi capaz de demonstrar uma tendência à diminuição. O consumo de oxigênio não foi alterado ao longo da perfusão, e a produção de lactato, apesar da diminuição não foi diferente estatisticamente. Já a toxina foi capaz de alterar a produção de piruvato e esta alteração foi diferente estatisticamente em relação ao grupo controle e veneno bruto, sendo $F(2-12) = 11,19$ e $p=0,0018$. Tal alteração não foi provocada pelo veneno bruto, embora este

grupo tenha demonstrado uma menor produção de piruvato quando comparado ao grupo controle. A figura 16 mostra as mudanças na produção de piruvato, lactato, glicose e no consumo de oxigênio ao longo dos 50 minutos de perfusão, e a tabela 6 os valores médios dos parâmetros em todas as coletas de perfusado.

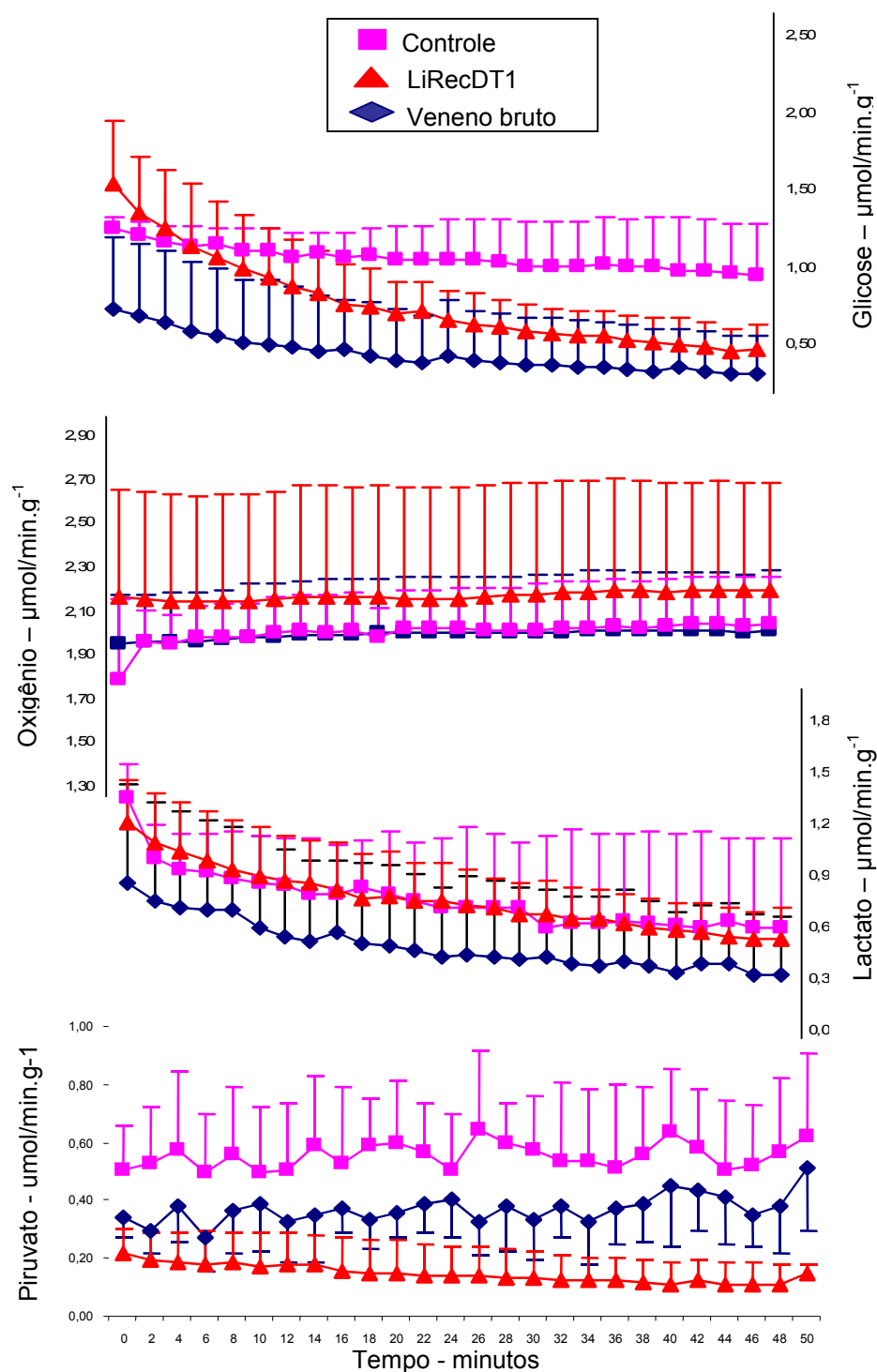


FIGURA 16 – Influência do veneno e da toxina de *Loxosceles intermedia* no metabolismo hepático de animais alimentados. As amostras foram coletadas a cada 2 minutos durante 50 minutos de perfusão, após 6 horas da inoculação do veneno, da toxina ou PBS. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média.

TABELA 6: INFLUÊNCIA DO VENENO E DA TOXINA DE *Loxosceles Intermedia* NO METABOLISMO HEPÁTICO DE ANIMAIS ALIMENTADOS. AS AMOSTRAS FORAM COLETADAS ATÉ 50 MINUTOS DE PERFUSÃO, APÓS 6 HORAS DA INOCULAÇÃO DO VENENO, DA TOXINA OU PBS.

Parâmetro	Controle	Veneno bruto	LiRecDT1
Produção de glicose	1,0213±0,0927 (n=4)	0,43134±0,1375* (n=5)	0,7623±0,1352 (n=3)
Consumo de oxigênio	1,82525±0,1893 (n=4)	2,1386±0,0969 (n=5)	2,161333±0,2858 (n=3)
Produção de lactato	1,061775±0,1568 (n=4)	0,566136±0,1875 (n=5)	0,7524±0,1269 (n=3)
Produção de piruvato	0,538475±0,0913 (n=4)	0,36982±0,0288 (n=5)	0,146673±0,0531*# (n=3)

Os dados representam a média ± erro padrão da média de todas as amostras coletadas em 50 minutos. ANOVA de uma via seguido de Tukey. ($p \leq 0,05$).

* difere do controle; # difere do veneno bruto.

6.5.2 Animais em jejum tratados com o veneno, toxina ou PBS.

Neste experimento, os animais ficaram em jejum por 24 horas até o momento da cirurgia, e durante a perfusão foi adicionada alanina 2,5uM como substrato. Da mesma maneira que ocorreu nos animais alimentados, a produção de glicose hepática a partir da alanina, no *steady state* sofreu uma diminuição, nos animais tratados com o veneno, a qual foi estatisticamente diferente do grupo controle ($F(2-13) = 4,673$; $p = 0,0340$). Já no grupo toxina, a produção de glicose foi menor, no entanto, não diferiu estatisticamente. A produção de uréia sofreu alteração no grupo veneno ($F(2-13) = 12,14$; $p = 0,0016$), diferindo estatisticamente do grupo controle e toxina. A formação de piruvato a partir da alanina foi maior no grupo toxina, comparado aos outros dois grupos ($F(2-13) = 14,10$; $p = 0,0009$). Não houve diferença entre os grupos na captação de oxigênio e na produção de lactato e amônia. As figuras 17 e 18 mostram as mudanças na produção de piruvato, lactato, glicose, amônia, uréia e no consumo de oxigênio durante os 60 minutos de perfusão hepática, e a tabela 7 mostra os valores médios da produção ou consumo destes mesmos parâmetros.

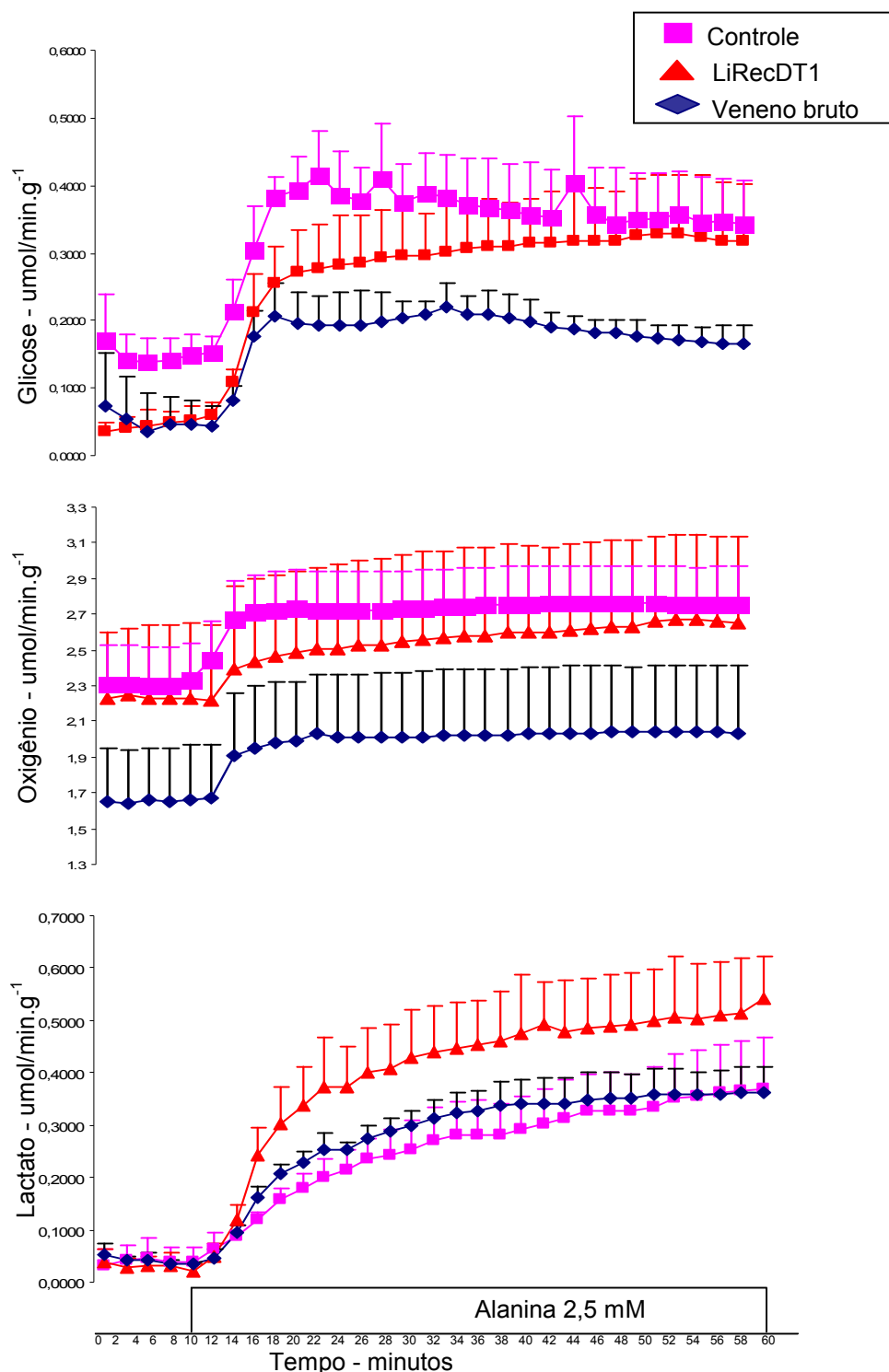


Figura 17 – Influência do veneno e da toxina de *Loxosceles intermedia* no metabolismo hepático de animais em jejum. As amostras foram coletadas até 60 minutos de perfusão, após 6 horas da inoculação do veneno, da toxina ou PBS. Após dez minutos de perfusão, ocorreu a entrada do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato com alanina 2,5 mM. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média.

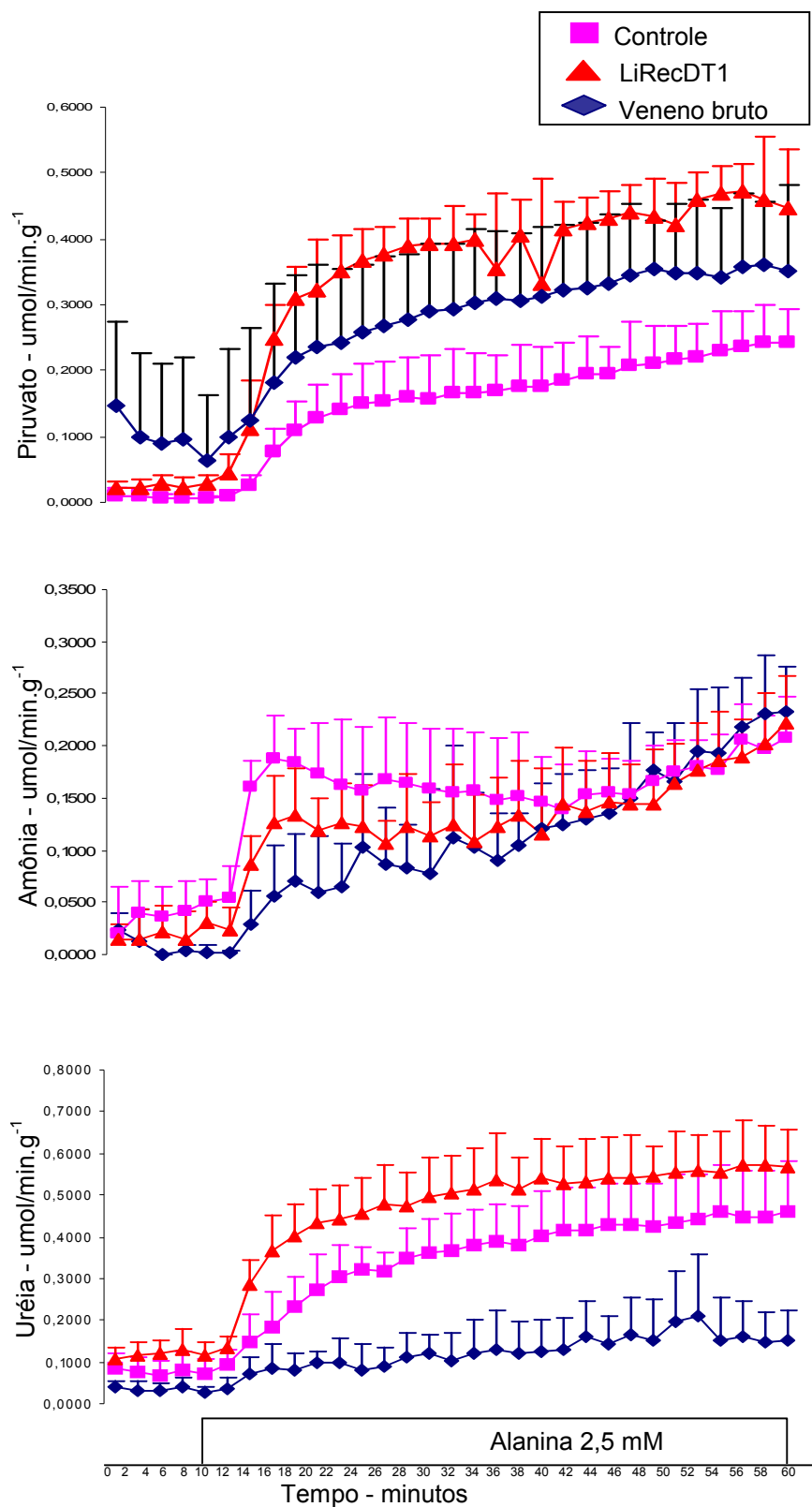


Figura 18 – Influência do veneno e da toxina de *Loxosceles intermedia* no metabolismo hepático de animais em jejum. As amostras foram coletadas até 60 minutos de perfusão, após 6 horas da inoculação do veneno, da toxina ou PBS. Após dez minutos, ocorreu a entrada do tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato com alanina 2,5 mM. Os dados representam a média \pm desvio padrão da média.

TABELA 7: INFLUÊNCIA DO VENENO E DA TOXINA DE *Loxosceles intermedia* NO METABOLISMO DA ALANINA, INFUNDIDA NA CONCENTRAÇÃO DE 2,5 mM. AS AMOSTRAS FORAM COLETADAS ATÉ 60 MINUTOS. O VENENO (80µg) E A TOXINA (80µg) FORAM INJETADOS NOS ANIMAIS E O FÍGADO COLETADO APÓS 6 HORAS.

Parâmetro	2.5mM alanina µmol min ⁻¹		
	Controle (n=5)	Veneno bruto (n=5)	LiRecDT1 (n=4)
Produção de glicose	0,2660 ± 0,03829 (n=5)	0,1395 ± 0,0284 [*] (n=5)	0,2203 ± 0,0475 (n=5)
Mudança na captação de oxigênio	0,4084 ± 0,05656 (n=5)	0,3822 ± 0,05080 (n=5)	0,4467 ± 0,0585 (n=5)
Produção de lactato	0,3361 ± 0,04981 (n=5)	0,3125 ± 0,02125 (n=5)	0,4706 ± 0,0939 (n=5)
Produção de piruvato	0,2379 ± 0,02168 (n=5)	0,2510 ± 0,02446 (n=5)	0,4182 ± 0,0516 ^{*#} (n=5)
Produção de amônia	0,2024 ± 0,02832 (n=5)	0,1803 ± 0,01378 (n=5)	0,1548 ± 0,0250 (n=5)
Produção de uréia	0,3490 ± 0,03716 (n=5)	0,1540 ± 0,04658 ^{*#} (n=5)	0,4340 ± 0,0681 (n=5)

Os dados representam a média ± o erro padrão da média do delta calculado com todos os pontos no steady-states antes e depois da infusão de alanina. ANOVA de uma via seguida de Tukey.

* difere do controle; # difere do outro tratamento.

6.6 Dosagem do glicogênio Hepático

O grupo tratado com 80µg de veneno bruto apresentou uma menor concentração de glicogênio hepático em relação ao grupo controle (t=5,511; p=0,0009), conforme mostrado na figura 19.

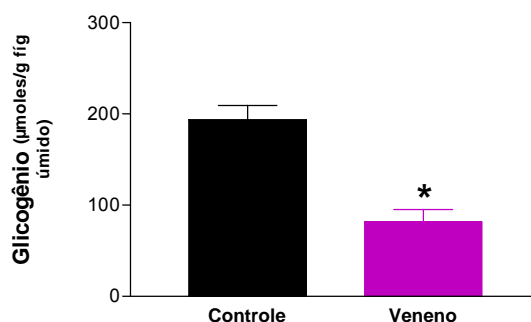


Figura 19 – Influência do veneno bruto de *Loxosceles intermedia* no glicogênio hepático. Os animais foram tratados com o veneno ou PBS e após 6 horas, o fígado foi retirado para a dosagem do glicogênio. Os dados representam a média ± erro padrão da média. (Teste T student, p≤0,05).

7. DISCUSSÃO

O fígado é o segundo maior órgão e a maior glândula do corpo, pesando cerca de 1,5 kg em humanos adultos, correspondendo a cerca de 1,8 a 3,1% do peso corpóreo (FILHO, 2006) e em ratos corresponde aproximadamente a 4,0% do peso corporal. Seu peso relativo é maior em fetos e crianças, correspondendo a 4 a 5% do peso ao nascimento e 3% ao final do primeiro ano de vida (ROBBINS *et al.*, 2001). Está situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma, localização ideal para a captação, biotransformação, acúmulo de metabólitos, neutralização e eliminação de substâncias tóxicas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Por ser um órgão provido de um sistema vascular específico, na dependência do sistema porta e sinusóides, a distribuição de toxinas e fármacos pode assumir diferentes padrões. As unidades funcionais do fígado, os ácinos hepáticos, têm particularidades que lhes permitem exercer diferentes funções conforme sua localização, nas quais a presença de enzimas, de organelas e a concentração de oxigênio são variáveis (FILHO, 2006). Isto permite explicar porque compostos afetam distintas zonas de ácinos, dependendo da concentração que os potenciais metabólitos tóxicos alcançam e da disponibilidade de vias metabólicas específicas no zoneamento hepático (ALBERTS *et al.*, 2006).

Em função da presença de enzimas, pertencentes ou não ao sistema citocromo P-450, o fígado é capaz de metabolizar substâncias, gerando compostos inativos, ativos ou ainda mais tóxicos (RANG *et al.*, 2004). Neste contexto, é muito provável que o veneno, assim como a toxina recombinante de *Loxosceles* atinjam os hepatócitos, onde poderão passar por processos de biotransformação e eliminação. Como há relatos, confirmados pelos nossos dados, de aumento das enzimas hepáticas, tais como a ALT e AST (BABCOCK *et al.*, 1980; FRANÇA; BARBARO; ABDULKALDER, 2002; ZAMBRANO *et al.*, 2005; de SOUZA *et al.*, 2007), é muito provável que o veneno bruto de *Loxosceles intermedia* promova algum tipo de lesão nas células funcionais do fígado, provocando a liberação destas enzimas para a corrente sanguínea. Este efeito foi observado nas análises bioquímicas realizadas, e confirmado pelo exame histopatológico.

O hepatócito é, provavelmente, a célula mais versátil do organismo, pois possui funções endócrinas e exócrinas, e tem a capacidade de acumular, detoxificar e transportar diversas substâncias (GARTNER & HIATT, 1997). Essas células estão

organizadas em placas e em cordões celulares interligados, com espaços preenchidos de sangue chamados sinusóides (ALBERTS *et al.*, 2006). São células epiteliais relativamente homogêneas, com aproximadamente 30µm de maior dimensão (FILHO, 2006). Os hepatócitos vivem um ano ou mais e são renovados lentamente, sendo que os mecanismos homeostáticos funcionam para ajustar a taxa de proliferação celular e ou a taxa de morte celular, de modo a manter o órgão em seu tamanho normal (ALBERTS *et al.*, 2006). Frente a um agente tóxico, dependendo da quantidade e toxicidade, pode ocorrer lesão nos hepatócitos e, desta forma, o extravasamento do conteúdo celular, liberando as enzimas armazenadas nos peroxissomos hepáticos (ASSI & NASSER, 1999). Ainda, o agente tóxico pode apenas promover alterações inespecíficas, como aumento da permeabilidade celular (BABCOCK *et al.*, 1980). Em humanos com loxoscelismo sistêmico, a elevação de AST e ALT é iniciada após 6 horas, permanecendo até 48 h a 5 dias (ZAMBRANO *et al.*, 2005; DE SOUZA *et al.*, 2007). Considerando que podem haver algumas diferenças metabólicas entre espécies, neste estudo o sangue para dosagens bioquímicas e o fígado para histopatologia dos ratos tratados foi coletado após 2, 4, 6 e 12 horas.

Como verificado nos resultados, o veneno da *L. intermedia*, na dose de 80µg provocou aumento das principais enzimas hepáticas após 6 horas, como a AST, ALT, gama GT e LDH, que, da mesma forma que a ALT, permaneceu aumentada após 12 horas. BABCOCK *et al.* (1980) encontraram aumento de LDH total e das isoformas 4 e 5 após seis horas da exposição ao veneno de *Loxosceles reclusa*. A isoforma 5 da LDH é encontrada somente no tecido hepático, mas o aumento da enzima total acompanhada do aumento de ALT e AST também comprova a hipótese de dano hepático (MEEKS *et al.* 2000). Nesse mesmo artigo foi dosada novamente a LDH após 54 horas, e a mesma havia retornado para os níveis basais. A coleta de sangue em tempos superiores a 12 horas no presente estudo, como 24 e 48 h, seria necessário para avaliar quanto tempo a LDH permanece aumentada após a administração do veneno em ratos.

A determinação de diferentes atividades enzimáticas no soro sanguíneo oferece informações valiosas no diagnóstico de lesões no fígado provocadas por drogas, tóxicos ou infecções (COOX & NELSON, 2006). A AST e a ALT são importantes no diagnóstico destas lesões por serem muito ativas neste órgão e

serem facilmente detectáveis em quantidades muito pequenas. A liberação de marcadores hepáticos para a corrente sanguínea está relacionada com o grau de lesão nos hepatócitos, a qual pode ser evidenciada pelos estudos de histologia. CORREA *et al.* (1997) através de dosagens enzimáticas em ratos tratados com o veneno de escorpião (*Serrulatus scorpion*) encontraram níveis aumentados para AST *in vitro* e ALT *in vivo*, e, frente a estes achados, atribuíram hepatotoxicidade ao veneno de escorpião. Em nosso estudo, houve um aumento da AST e ALT após seis horas no grupo tratado com o veneno bruto, e somente aumento de ALT no grupo toxina LiRecDT1. A ALT é mais específica que a AST, pois é encontrada em menos tecidos (MEEKS, 2000), e é mais sensível aos processos de inflamação nas células hepáticas, visto que está presente praticamente nos hepatócitos, ao contrário da AST, que está presente no coração e músculos esqueléticos (ZIMMERMAN e HARRY, 1974). Frente a esse parâmetro, além das evidências de que o veneno tem efeito hepatotóxico quando injetado subcutaneamente em ratos, a toxina parece ser apenas um dos componentes importantes no processo hepatotóxico do loxoscelismo sistêmico, mas não o único. Ao se comparar os resultados obtidos nas análises plasmáticas com a toxina LiRecDT1 e o veneno bruto, ficou muito evidente tal afirmação, pois em nenhuma comparação a toxina LiRecDT1 apresentou-se mais agressiva do que o veneno bruto.

A gama GT é uma enzima inespecífica para lesão hepática (MEEKS *et al.*, 2000). O aumento dos seus níveis ocorre em uma grande quantidade de transtornos como, por exemplo, distúrbios na drenagem biliar, tumores de glândula biliar ou enfermidade hepática associada a tóxicos, como o álcool. É importante a análise do conjunto enzimático para interpretação dos resultados. No caso do alcoolismo, o aumento isolado dessa enzima já comprova o uso, pois o álcool é um indutor direto da gama GT (COOX & NELSON, 2003). Já para avaliação da obstrução biliar, o aumento da fosfatase alcalina é diagnóstico, apesar de ser encontrada em diversos órgãos, como placenta, ossos, intestino e fígado (COOX & NELSON, 2003). Como em nosso estudo o aumento de gama GT foi associado ao de AST e ALT, pode-se inferir que houve lesão inespecífica causada por tóxico (DEVLIN, 2007), neste caso, apenas pelo veneno bruto.

Encontrou-se somente um estudo que associa lesões hepáticas com diminuição da atividade da acetilcolinesterase (MEEKS *et al.*, 2000). Já BABCOCK

et al. (1980) encontraram aumento da atividade desta enzima associado ao veneno de *L. reclusa*. Nossos resultados com o veneno de *L. intermedia* não corroboram esses achados, uma vez que não houve alteração na atividade plasmática da enzima.

A dosagem plasmática de uréia também não foi diferente estatisticamente. Já no estudo de LUCIANO *et al.* (2004) e CHAIM *et al.* (2006), houve elevação dos níveis de uréia em camundongos após 6 h de inoculação. No presente estudo, na construção da curva tempo-resposta, após 12 horas de exposição tanto ao veneno, quanto à toxina LiRecDT1, a curva de uréia plasmática sofreu elevação, mas estatisticamente não foi significativa. Um tempo maior de coleta poderia mostrar uma diferença significativa, sendo que em ratos, a uréia deve sofrer elevação em um tempo superior a 12 h. Nos experimentos de perfusão monovascular em fígado de rato, foi possível verificar que a produção de uréia a partir da alanina nos animais em jejum tratados com o veneno foi menor que a produção do grupo controle. Este resultado sugere que metabolicamente estaria ocorrendo uma diminuição da produção de uréia em indivíduos envenenados com *L. intermedia*, mas que a quantidade formada não estaria sendo excretada pelos danos renais que comprovadamente o veneno provoca (CHAIM *et al.*, 2006), o que elevaria a azotemia, que comumente é detectada no LVC.

Com o intuito de verificar se o veneno e a toxina têm afinidade pelo tecido hepático e se exercem os efeitos tóxicos por ação direta, foi realizada a imunofluorescência com microscopia de fluorescência convencional, utilizando anticorpos contra as proteínas do veneno e da toxina LiRecDT1. Esta reação, como mostrada nos resultados, foi positiva para os fígados tratados com o veneno bruto e com a LiRecDT1 após seis e 12 horas da inoculação (FIGURAS 10, 12 e 13), sendo negativa para os horários anteriores. Os ensaios de competição, utilizando toxinas do veneno de *L. intermedia* com anticorpos anti-veneno, e a própria LiRecDT1 com anticorpos anti-toxina, bloquearam a positividade da fluorescência (LUCIANO *et al.*, 2004) nos fígados expostos ao veneno e à toxina, suportando a idéia de que tanto o veneno bruto, quanto a toxina estão ligados ou depositados no tecido hepático. LUCIANO *et al.* (2004) e CHAIM *et al.* (2005) comprovaram a presença do veneno e da toxina LiRecDT1, respectivamente, em tecido renal usando esta técnica, demonstrando que a lesão renal pode ser consequência da deposição direta nas

células dos rins.

Como o fígado é o principal órgão responsável pela biotransformação (MEEKS *et al.*, 2000), é possível que a presença tanto do veneno, quanto da toxina, no fígado, seja em consequência deste processo. Em 12 horas, a imunofluorescência continuou positiva, corroborando os achados enzimáticos e as alterações histológicas, e suportando a idéia de que há dano hepático agudo por ação direta do veneno. No entanto, estudos futuros utilizando tempos posteriores e mais prolongados serão necessários para verificar se esta lesão tem caráter crônico.

A análise macroscópica (subjetiva, não mostrada) evidenciou que os fígados dos animais tratados com o veneno de *L. intermedia* e coletados após seis horas, apresentaram-se pálidos. Tal achado também foi observado em fígados de camundongos e ratos tratados com outros venenos, como de lesma-do-mar do gênero *Conus loroisii* e de cobra do gênero *Philodryas patagoniensis* (PEICHOTO *et al.*, 2006; SAMINATHAN *et al.*, 2006), em trabalhos que também relataram aumento de enzimas hepáticas como a AST e ALT.

Considerando o perfil enzimático plasmático encontrado nos animais intoxicados com o veneno loxoscélico e a positividade das amostras de imunofluorescência, foi realizado exame histopatológico do fígado, pois a microscopia óptica pode confirmar a natureza e o grau de lesão hepática. Sendo o fígado um órgão eminentemente parenquimatoso, as alterações hepatocelulares têm grande importância no diagnóstico de hepatopatias (FILHO, 2006). PEICHOTO *et al.* (2006) uniram as duas análises em ratos Sprague Dawley inoculados com o veneno de cobra *Philodrias patagoniensis*, e encontraram alterações em níveis de AST, ALT e LDH associadas à presença de hepatócitos perivenosos com tumefação. Para os animais tratados com o veneno bruto de *Loxosceles intermedia*, foi encontrada esta alteração além de outras, proporcionais ao tempo de exposição. A toxina LiRecDT1 também foi capaz de causar alterações tempo-dependentes, no entanto, mais sutis do que as do veneno bruto. Após duas horas de coleta de fígado de rato tratado com veneno ou toxina, houve o início da proliferação de leucócitos monomorfonucleares no interstício hepático, o que pode ser indicativo de presença de necrose (GARTNER & HIATT, 1997). Após quatro horas, o infiltrado aumentou em ambos os tratamentos, e áreas de hepatócitos com halos perinucleares foram encontradas. Esses halos correspondem a uma região mais clara que o citoplasma ou com

ausência de coloração. Este é o melhor critério citológico para avaliação da presença de quadro inflamatório (ROBBINS *et al.*, 2001), associado à presença de leucócitos na região (FILHO, 2006), indicando, portanto, que o veneno induz certo grau de reação inflamatória no fígado.

Os fígados coletados após seis horas apresentaram aumento significativo de leucócitos, sendo que no grupo veneno, ocorreu a formação de microabscessos de leucócitos polimorfonucleares. AZNAURIAN & AMIRYAN (2006), utilizando coelhos tratados com veneno de cobra (*Vipera raddei*), encontraram esses microabscessos entre os cordões de hepatócitos e quantidades significativas de hemosiderina, atribuindo estes achados à ação direta do veneno no tecido hepático. Também, somente nesta hora, ocorreu formação de hepatócitos tumefatos. Neste tipo de alteração, o citoplasma é abundante e claro, devido à entrada de água, com dispersão das organelas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A entrada de água se deve a distúrbios metabólicos da célula, especialmente da bomba de sódio da membrana plasmática, provavelmente por um efeito direto do veneno. Essas células apresentam-se gravemente lesadas e destinadas a morrer (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A tumefação é um achado comum em doenças hepáticas como a hepatite (SAMINATHAN *et al.*, 2006), principalmente as virais agudas, podendo acompanhar-se de destrabeculação e necrose dos hepatócitos. As células tumefatas, normalmente, apresentam uma descoloração do citoplasma, sendo que a perda da afinidade tintorial é devida provavelmente a alterações na conformação das proteínas que compõem as citoceratinas (FILHO, 2006). AVASALARA *et al.* (2006) encontraram hepatócitos com tumefação após camundongos *knockout* para duas enzimas do citocromo P450 (Cyp1e1^{-/-} e Cyp2e1^{+/+}) serem expostos ao tetracloreto de carbono, administrado pela via intraperitoneal.

Somadas às alterações histológicas supracitadas, os dois tratamentos do presente trabalho evidenciaram células apoptóticas e hepatocitólise, comprovando que o veneno e a toxina devem atuar de forma degenerativa sob as células hepáticas. Na apoptose, o citoplasma dos hepatócitos torna-se condensado e densamente eosinofílico, e o núcleo sofre picnose, cariorréxe ou cariólise, chegando a desaparecer totalmente. As células retraídas que não se destacam das trabéculas são conhecidas como células escuras, que foram encontradas no presente estudo, e que quando caem na luz sinusoidal constituem os chamados corpos acidófilos

(FILHO, 2006).

O quadro geral das lesões histológicas encontradas não possui características crônicas, pois não há formação de tecido fibroso (PEICHOTO *et al.*, 2006). Pelo contrário, possui característica de lesão reversível. Essa hipótese pode ser confirmada pelo aumento de células em mitose, encontradas já após seis horas de exposição (FIGURA 18E). Apesar de o fígado possuir um ritmo lento de renovação celular, possui uma capacidade de regeneração extraordinária (GARTNER & HIATT, 1997). Lesões hepáticas de origem variada levam as células remanescentes a proliferar numa tentativa de restabelecer a integridade estrutural do órgão, constituindo o fenômeno de regeneração hepática (FILHO, 2006). Em fígado normal, os hepatócitos, em sua grande totalidade, permanecem na fase G₀ do ciclo celular. Durante a regeneração e após a lesão, a atividade mitótica dos hepatócitos evolui como uma onda, começando nas áreas periportais e avançando progressivamente para a região centrolobular (GARTNER & HIATT, 1997). Os lóbulos hepáticos tendem, a ser maiores do que os lóbulos originais, e os hepatócitos se dispõem em cordões duplicados, em vez de cordões simples originais, no entanto, o órgão é perfeitamente funcionante (FILHO, 2006). Assim, com a perda de tecido hepático pela ação de substâncias tóxicas, como o veneno de *Loxosceles intermedia*, ocorre o disparo de mecanismos pelos quais os hepatócitos começam a se multiplicar, até que a massa original de tecido danificada seja restaurada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Os fígados tratados com o veneno bruto e coletados após 12 horas, mostraram uma diminuição da presença de leucócitos, no entanto, um achado importante foi a presença de esteatose. A esteatose é uma alteração morfofisiológica que ocorre em consequência a diversas desordens metabólicas (ROBBINS *et al.*, 2001). No ser humano, pode ser observada em três situações: desnutrição crônica, diabetes melito descompensado e alcoolismo crônico (ROBBINS *et al.*, 2001). Os hepatócitos normalmente sintetizam lipídeos e os exportam para o tecido de armazenamento, que é o tecido adiposo. Em condições normais de boa alimentação e metabolismo, não há acúmulo de triglicerídeos no hepatócito. A esteatose, que representa este acúmulo, pode decorrer do excesso da oferta de ácidos graxos, excedendo a capacidade do hepatócito em processar e exportar esta gordura, ou da deficiência da produção de lipoproteínas, principalmente a VLDL.

Substâncias tóxicas, no entanto, também podem causar esteatose, pois produtos tóxicos de várias naturezas podem prejudicar a síntese protéica nos hepatócitos. Um exemplo é o tetracloreto de carbono, cujo metabólito é o radical livre CCl_3 , altamente reativo, que agride as membranas do retículo endoplasmático rugoso e causa dispersão dos ribossomos. Isto leva à inibição da síntese protéica e à esteatose, que ainda é um processo reversível (AVASARALA *et al.*, 2006), não sendo associada a doenças progressivas (FILHO, 2006). A remoção dos fatores causais leva à mobilização da gordura acumulada e à restauração do aspecto normal. Porém, a persistência prolongada da esteatose, associada a outras agressões, pode levar à destruição progressiva dos hepatócitos, com fibrose difusa do parênquima e perda da arquitetura funcional do fígado, como na cirrose hepática (ROBBIN *et al.*, 2001). SAMINATHAN *et al.* (2006) também verificaram a presença de esteatose em fígado de camundongos tratados com o veneno de lesma-do-mar (*Conus loroisii*), atribuindo tal achado à toxicidade deste veneno, que, provavelmente, agiu diminuindo a síntese protéica. Encontraram também migração leucocitária na região venular e portal, além de alterações plasmáticas de AST, ALT, LDH, e fosfatase alcalina, comprovando o efeito hepatotóxico. A exemplo deste, muitos trabalhos utilizando veneno de animais peçonhentos, como aranhas e cobras, evidenciam danos hepáticos suportados por técnicas histológicas, com infiltração de leucócitos, e alterações enzimáticas (SHEN *et al.*, 2001; ADZU *et al.*, 2005), do mesmo modo que em nosso estudo.

Como foram evidenciadas várias alterações indicativas de dano celular, foi utilizada a técnica de perfusão monovascular de fígado isolado para verificar se esses danos estariam comprometendo as funções metabólicas hepáticas. Como o comprometimento maior ocorreu em seis horas, a perfusão foi realizada neste mesmo tempo nos animais que receberam veneno bruto, toxina ou PBS. Para tanto, dois protocolos de perfusão foram utilizados: o primeiro usou animais alimentados, e o segundo animais em jejum (24 horas), nos quais os fígados perfundidos tiveram a gliconeogênese, amoniogênese e ureagênese estimulada com alanina 2,5mM como substrato. Em músculo, fígado e muitos outros tecidos, a degradação de alanina é empregada como combustível (COOX & NELSON, 2006) para a obtenção de energia. A alanina é considerada um aminoácido glicogênico porque é precursora da glicose, podendo ser convertida em piruvato e, portanto, podendo levar à formação

de glicose e glicogênio (COOX & NELSON, 2006; FEDATO - JUNIOR *et al.*, 1999), além de ser um aminoácido doador de grupamentos NH_4 para a produção de uréia (COX & NELSON, 2006).

A produção de glicose foi menor em relação ao controle, nos grupos tratados com o veneno tanto nos animais alimentados, quanto nos animais em jejum. A diminuição da produção de glicose pode ser indicativa da ação do veneno, provavelmente nas vias da gliconeogênese, glicogênese e glicogenólise. Ainda, na presença do veneno os hepatócitos podem necessitar de maior produção de energia para compensar suas ações intracelulares. Assim, não necessariamente, o veneno impede a formação de glicose (gliconeogênese) e de glicogênio, mas aumenta a sua utilização celular.

Alguns animais permaneceram 24 horas em jejum, portanto seus estoques de glicogênio muito provavelmente já estavam esgotados, e para a reposição de glicose, a única via possível, seria a gliconeogênese. Entretanto, mesmo após a infusão de alanina, a produção de glicose foi menor no grupo veneno. A alanina, que é um aminoácido glicogênico, pode ser convertida a piruvato através de uma reação de transaminação, sendo que a enzima responsável por tal transaminação, é a ALT (CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004), que se evidenciou aumentada no sangue nos dois tratamentos (toxina e veneno). Esse aumento da enzima na corrente circulatória indica seu extravasamento citoplasmático e redução dos níveis intracelulares (WILLIAMS & SIDDIQUI, 1990), o que poderia comprometer o início da gliconeogênese nos animais tratados, diminuindo a conversão da alanina em piruvato. No entanto, a produção de piruvato não foi alterada nos animais em jejum tratados com o veneno, situação também encontrada por CORBELO - PEREIRA *et al.* (2004), que atribuíram tal achado a um carreador de monocarboxilatos que opera de maneira independente da concentração de piruvato. Portanto, o veneno pode estar exercendo efeito em outros eventos relacionado à gliconeogênese, inibindo enzimas reguladoras do processo, alterando o funcionamento de carreadores e não unicamente na conversão da alanina a piruvato. Alguns autores, ainda, encontraram que a atividade da ALT predomina em hepatócitos periportais, e embora uma maior atividade gliconeogênica a partir da alanina seja encontrada na mesma região, observações paralelas sugerem fortemente que ela não se deve primariamente a predominância periportal da ALT e sim, provavelmente, à predominância periportal

geral da via gliconeogênica dependendo do substrato disponível para a produção de glicose (COMAR *et al.*, 2007). Existem outras variáveis que podem estar envolvidas na diminuição da gliconeogênese, como o baixo potencial redox NADH/NAD⁺ ou potenciais citosólicos diferentes na presença do veneno, como uma possível diminuição de níveis energéticos, e de ATP (CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004), inibição do transporte de substratos para a gliconeogênese, inibição de outras enzimas do processo, ou mesmo situações específicas induzidas por hormônios (FEDATO-JUNIOR *et al.*, 1999). No entanto, FEDATO-JUNIOR *et al.* (2004), em modelos de ratos com artrite, testaram a resposta à alanina na produção de glicose e utilizaram também o hormônio glucagon, e a presença do hormônio não reverteu a diminuição na produção de glicose, demonstrando que neste caso, a diminuição da gliconeogênese não possui relação hormonal. Tal hipótese não foi testada no presente estudo.

O consumo de oxigênio pelo tecido hepático não diferiu estatisticamente entre os tratamentos em nenhum dos dois grupos testados. A produção de lactato em ambos os grupos também não foi diferente estatisticamente, no entanto, o grupo alimentado apresentou uma tendência à diminuição na produção. O lactato é formado a partir do piruvato, através da enzima LDH (DEVLIN, 2007), a qual está aumentada no sangue de animais tratados com o veneno, após 6 e 12 horas. (FIGURA 07). Esse extravasamento da enzima para a corrente circulatória poderia comprometer a formação de lactato no citosol dos hepatócitos.

Alguns trabalhos mostram que a amônia pode inibir a gliconeogênese (MARTIN-REQUERO *et al.*, 1993; YASSUDA –FILHO *et al.*, 2003; CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004; COMAR *et al.*, 2007) e esse seria um fator importante a ser considerado neste trabalho, no entanto não houve aumento da amoniogênese nos ratos em jejum, apenas no início da infusão da alanina na perfusão. A gliconeogênese também pode ser afetada em situações em que há diminuição de enzimas regulatórias deste processo. Em estados inflamatórios agudos induzidos por endotoxinas de bactérias, há uma diminuição, por exemplo, da expressão da fosfoenol piruvato carboxiquinase, uma enzima regulatória, e tal diminuição compromete a formação de glicose. (FEDATO - JÚNIOR *et al.*, 1999). Esta observação é importante do ponto de vista clínico, uma vez que durante a picada da aranha marrom, pode haver, além da inoculação do veneno, a injeção de bactérias

normalmente presentes nas quelíceras das aranhas, sendo que a principal bactéria inoculada é o *Clostridium perfringens*, e estudos confirmaram que tanto as lesões cutâneas, quanto o loxoscelismo sistêmico podem ser agravados pela endotoxina desta bactéria e de outras. (DA SILVA *et al.*, 2004).

No grupo de animais alimentados também ocorreu diminuição na produção de glicose estatisticamente significativa nos animais tratados com o veneno, corroborando com os resultados obtidos com a dosagem de glicogênio. Já os valores do grupo toxina não foram diferentes estatisticamente, embora uma tendência à diminuição da produção tenha ocorrido. Os animais tratados com a toxina tiveram diminuição estatisticamente significativa na produção de piruvato. Esses resultados corroboram a hipótese de que a via da gliconeogênese poderia estar bloqueada em função da diminuição do piruvato, que é um importante precursor de glicose (COOX & NELSON, 2006), associado ao fato do aumento da ALT na corrente circulatória. Além disso, no grupo veneno, a diminuição de lactato também poderia comprometer a gliconeogênese, uma vez que esta substância também é importante precursor de glicose (DEVLIN, 2007).

Existem ainda outras substâncias gliconeogênicas e outras vias para a obtenção de glicose, como a glicogenólise, que no caso dos animais alimentados, também poderia ser afetada pelo veneno (FIGURA 19). O glicogênio nos tecidos pode ser mobilizado para uso e envolve uma seqüência de reações até a formação da glicose-6-fosfato que pode entrar na via glicolítica ou em outra via, como a das pentoses-fosfato (COOX & NELSON, 2006). O veneno bruto interferiu na formação, provavelmente, do glicogênio, uma vez que o nível de glicogênio hepático foi significativamente menor do que dos animais controle. Desta forma, o veneno pode estar interferindo nos processos de formação do glicogênio, muito provavelmente pela própria oferta de glicose estar diminuída, de forma a inibir a captação de glicose para a formação de glicogênio, ou mesmo inibir a glicogênese. Esse resultado explica, também, a diminuição da glicose nos animais alimentados. Além disso, a produção de glicogênio ocorre, preferencialmente, na região perivenosa (JUNGERMANN & KATZ, 1982), o que é compatível com as alterações histológicas encontradas nesta região, como a infiltração de leucócitos. Muitos fármacos utilizados na terapêutica, em doses altas também podem comprometer a gliconeogênese e a glicogenólise, como o anestésico propofol (ACCO *et al.*, 2004) e o

antiflamatório ácido mefenâmico (KEMMELMEIER & BRACHT, 1989).

A produção de amônia ocorre de forma incessante através do catabolismo dos aminoácidos. Entre os pontos iniciais está a separação do grupo amino do esqueleto carbônico dos aminoácidos. Na maioria dos casos, o grupo amino é transferido ao α -cetoglutarato para a formação de glutamato, o qual é transportado para a mitocôndria de hepatócitos, onde ocorre a liberação do grupo amino na forma de íon amônio (COOX & NELSON, 2006). A amônia que é formada em outros tecidos é transportada até o fígado como grupo amida da glutamina ou até os músculos esqueléticos como grupo amino da alanina, a qual segue até o fígado. Desta forma, a alanina e a glutamina são os precursores mais importantes para a síntese de uréia (MEIJER & HENSGENS, 1982), uma vez que o destino do grupo amino é a síntese de novos aminoácidos através da formação do glutamato (MEIJER & HENSGENS, 1982), ou outros compostos nitrogenados, alternativamente, esses grupamentos são canalizados para a formação da uréia, a qual é a principal forma de excreção de nitrogênio (COOX & NELSON, 2006). A amônia precisa ser excretada na forma de uréia por ser tóxica, principalmente para o tecido cerebral, sendo que a intoxicação pode levar ao aumento da pressão intracraniana e edema cerebral (ROBBINS *et al.*, 2001). Através do gráfico representado na figura 18, pode-se perceber que a produção de amônia do grupo veneno em certos períodos foi menor que a do controle, indicando que a resposta à alanina para a síntese de amônia foi mais lenta inicialmente, mas equiparou-se aos níveis de produção do grupo controle ao final da perfusão.

A transformação de amônia em uréia foi considerada menor pelo estímulo da alanina, a qual sabidamente acelera a ureagênese a partir da amônia (CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004). Com isso, o catabolismo da alanina está diminuído na presença do veneno, e, somadas a estas observações, as alterações provocadas pelo veneno alteram diretamente o ciclo da uréia, ou seja, a conversão da amônia em uréia.

A ureagênese é um processo que ocorre essencialmente no fígado a partir de aminoácidos (arginina, alanina, glutamina...) e faz parte do sistema hepático de detoxificação de amônia, ocorrendo no parênquima hepático e nas células perivenosas, com excessão da pequena fração de células hepáticas que não possui a enzima carbamoil-fosfato sintase I (COMAR *et al.*, 2007), reguladora deste

processo. (COOX & NELSON, 2006). O primeiro grupo amino que entra no ciclo da uréia é derivado do íon amônio, originado na matriz mitocondrial. Um segundo grupo amino é originado do aspartato, gerado na mitocôndria por transaminação e em seguida transportado para o citosol (COOX & NELSON, 2006; MEIJER & HENSGENS, 1982). A enzima responsável pela transaminação é a AST, que se encontra aumentada no plasma de animais tratados com o veneno, sugerindo desta forma, que a produção de uréia poderia estar diminuída pela redução do número de grupamentos aminos originários do aspartato. Em perfusões de fígado de ratos, onde a concentração de amônia é baixa, não foi observado acúmulo dos intermediários do ciclo da uréia, sendo que a quantidade de uréia produzida é igual à quantidade de consumo de NH_3 (MEIJER & HENSGENS, 1982). Nestas condições a síntese de carboil fosfato sintetase, uma enzima não pertencente ao ciclo da uréia, embora essencial (DEVLIN, 2007), torna-se mais lenta pela baixa oferta de amônia (MEIJER & HENSGENS, 1982). Neste estudo a produção de amônia diminuiu, no início da entrada da alanina, mas em seguida equiparou-se com os níveis do controle, implicando que não foi uma diminuição na síntese da enzima que provocou a baixa formação de uréia, mas provavelmente o seu extravasamento devido ao aumento da permeabilidade da mitocôndria de hepatócitos frente ao veneno. Além disso, se o veneno é capaz de aumentar a permeabilidade do hepatócito, como faz em outras células, como por exemplo, no endotélio vascular (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2004; TAVARES *et al.*, 2004; SWANSON & VETTER, 2006), poderá acarretar também o extravasamento de outras enzimas do ciclo também, comprometendo a formação da uréia.

O ciclo da uréia gera intermediários que, dependendo do transporte destes do citosol para o interior da mitocôndria, podem conectar-se ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (DEVLIN, 2007), embora as duas vias funcionem independentemente. No entanto, a diminuição do ciclo da uréia poderia diminuir a entrada desses intermediários, comprometendo o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, ou apenas promovendo um desvio de rotas metabólicas para gerar precursores importantes para este ciclo. A diminuição de ATP intracelular e baixo potencial redox NADH/NAD^+ também podem interferir na produção de uréia. Baixa concentração de NADPH também poderia alterar o ciclo, quando a síntese de uréia ocorre essencialmente a partir da amônia (MEIJER & HENSGENS, 1982).

A circulação de diferentes peptídeos tais como TNF α , interleucinas, citocinas e proteínas devida às lesões dermonecroticas induzidas por *Loxosceles*, pode desviar aminoácidos para o tecido e músculo esquelético, desviando esses substratos do ciclo da uréia (CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004). No entanto, ratos não desenvolvem lesão dermonecrotica, portanto, esta seria uma consideração importante no caso de loxoscelismo em humanos.

A elevação dos níveis plasmáticos de uréia é indicativa de altas taxas de dissipação de nitrogênio e suprimento diferenciado de compostos nitrogenados (CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004), o que pode ser a causa da azotemia no envenenamento por *Loxosceles*. Mesmo com a reduzida produção de uréia no fígado estando menor, o que comprova efeitos do veneno sobre as funções hepáticas, a quantidade que ainda está sendo formada, não é eliminada pelos rins, estando relacionado, em grande parte, à redução da taxa de filtração glomerular, decorrente de efeitos diretos e indiretos do veneno e da toxina LiRecDT1 nos rins (CHAIM *et al.*, 2006).

A somatória dos resultados obtidos com as diferentes técnicas utilizadas neste trabalho confirma a hipótese de que o veneno de *Loxosceles intermedia* é hepatotóxico, uma vez que produziu aumento de marcadores hepáticos no sangue, alterações histológicas importantes e alterações metabólicas, pois o fígado entre outros eventos, reduziu a capacidade de responder à alanina. Entretanto, é sabido que as respostas *in toto* dependem de concentrações plasmáticas e celulares de substâncias gliconeogênicas e da concentração de fatores regulatórios (CORBELO-PEREIRA *et al.*, 2004). Ainda, com base nos resultados obtidos, é possível inferir que o veneno de *Loxosceles intermedia* é uma hepatotoxina direta por promover lesão nas células hepáticas, e indireta por atuar em rotas metabólicas específicas (MEEKS *et al.*, 2000).

Finalmente, frente aos efeitos provocados pelo veneno e pela toxina LiRecDT1, é possível inferir que esta toxina não é o único componente do veneno responsável pelos danos hepáticos, mas tem papel relevante na formação das lesões e nos distúrbios metabólicos. Um fator importante a ser considerado, é o fato de que 80 μ g de toxina não foram capazes de produzir a extensão do dano provocado pelo veneno, usado na mesma concentração. O veneno bruto mostrou-se mais tóxico, visto que é uma mistura complexa, contendo muitas frações ativas e a

sua ação tóxica surge do efeito combinado destes componentes (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004). Além disso, diferentes isoformas da mesma toxina possuem propriedades biológicas diferentes (RIBEIRO *et al.*, 2007), sugerindo desta forma, que outras isoformas da fosfolipase D podem apresentar atividade tóxica no fígado. CHAIM *et al.* (2005) conseguiram reproduzir toda a extensão dos danos renais obtidos com o veneno bruto de *L. intermedia* utilizando somente a toxina LiRecDT1, fato que não ocorreu no presente trabalho, indicando que esta isoforma da toxina dermonecrótica é responsável pela lesão renal e não é isoladamente responsável pelos danos hepáticos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados enzimáticos, metabólicos e histopatológicos obtidos, pode-se sugerir que o veneno bruto de *L. intermedia* possui ação hepatotóxica aguda dose-dependente, sendo que o ápice da alteração em ratos, variedade Wistar, ocorre seis horas após a exposição. A fosfolipase D possui um papel importante, mas não é a única proteína capaz de produzir a extensão das lesões hepáticas encontradas nos animais tratados com o veneno.

Ainda, é salutar sugerir que indivíduos com loxoscelismo sistêmico sejam assistidos de forma diferente da atualmente praticada em unidades de saúde, e que a avaliação de enzimas plasmáticas marcadoras da função hepática torne-se parte do protocolo de atendimento aos pacientes com loxoscelismo. Os danos encontrados neste estudo são agudos e provavelmente reversíveis, no entanto, indivíduos com comprometimento hepático, idosos e crianças devem ter atenção especial, pois são mais susceptíveis aos efeitos do veneno.

9. REFERÊNCIAS

- ACCO, A.; BRACHT, A. Transport, transformation and distribution space of propofol in the rat liver studied by means of the indicator-dilution technique. **Xenobiotica**, v. 34(4), p. 317-334, 2004.
- ADZU, B.; ABUBAKAR, M.S.; IZEBE, K.S.; AKUMKA, D.D.; GAMANIEL, K.S. Effect of *Annona senegalensis* rootbark extracts on *Naja nigricollis nigricollis* venom in rats. **Journal of ethno-pharmacology**, v.96, p. 507-513, 2005.
- ALBERTS, B.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4^o ed: Artmed, São Paulo, 2006.
- ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.37, p. 627-632, 1999.
- ANDRADE, S.A.; MURAKAMI, M.T.; CAVALCANTE, D.P.; ARNI, R.K.; TAMBOURGI, D.V. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.47, p. 380-386, 2006.
- APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Insight into brown spider and loxoscelism. **Invert. Sc. Journ**, v.2, p.152-158, 2005.
- ASSI, A.A; NASSER, H. An in vitro and in vivo study of some biological and biochemical effects of *Sistrurus Malariaus Barbouri* venom. **Toxicology**, v.137, p.81-94, 1999.
- AVASARALA, S.; YANG, A.L.; SUNA, Y.; WAN-CHI LEUNG, V. B.; CHANC, W.Y.; CHEUNGA, W.T.; SAU-TUEN LEE, S. A temporal study on the histopathological, biochemical and molecular responses of CCl₄-induced hepatotoxicity in Cyp2e1-null mice. **Toxicology**, v.228, p. 310-322, 2006.
- AZNAURIAN, A.V.; AMIRYAN, S.V. Histopathological changes induced by the venom of the snake *Vipera raddei* (Armenian adder). **Toxicon**, v.47, p.141-143, 2006.
- BABCOCK, J.L.; SUBER, R.L.; FRITH, C.H.; GEREN, C.R. Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v.4, p. 463-471, 1981.
- BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *L. Gaucho* spider venom. **Toxicon**. v. 30, p. 331-338, 1992.
- BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *L. Gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, v. 32, p. 687-693, 1994.

BARBARO, K.C.; FERREIRA, M.L.; CARDOSO, D.F.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *L. Spiders*. **Braz. J. Med. Bio. Res**, v.29, p. 1491-1497, 1996.

BARBARO, K.C.; Knysak, I.; Martins, R.; Hogan, C.; Winkel, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles spider* venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v.45 (4), p.489-499, 2005.

BARRETO, C.O.; CARDOSO, J.L.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose – 6-phosphate deficiency. **Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 27, p. 264, 1985.

BEAUTLER, E.; LITCHMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J. Williams. **Hematology**. New York: McGraw Hill, 1995.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. London: Academic Press, 1974. pp. 1205-1215.

BERGMEYER, H.U. Determination of urea with glutamate dehydrogenase as indicator enzyme. In: BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. London: Academic Press, 1974. pp. 1794-1801.

BOTINI, F.F.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; NASCIMENTO, E.A.; IDE, L.T.; BRACHT, A. Zonation of alanine metabolism in the bivascularly perfused rat liver. **Liver International**, v.25, p. 861-871, 2005.

BRACHT, A.; ISHII- IWAMOTO, E.L.; KELMER-BRACHT, A.M. O Estudo do metabolismo no fígado em perfusão. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L. M. **Métodos de laboratório em Bioquímica**. São Paulo: Manole, 2003. pp.275-289.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 228-254, 1976.

CHAIM, O.M. **Estudo da atividade citotóxica da proteína dermonecrótica do veneno da aranha marrom (*Loxosceles intermedia*) com ênfase no efeito nefrotóxico**. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular, Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná, 2005.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; DA SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; SANCHES-VEIGA S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol. App. Pharmacol.** v. 211(1), p. 64-77, 2006.

COMAR, J.F.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; NASCIMENTO, E.A.; BRACHT, A. Flexibility of the hepatic zonation of carbon and nitrogen fluxes linked to lactate and pyruvate transformations in the presence of ammonia. **Am J Physiol Gastrointest liver Physiol**, v. 293, p. 2007.

COOX, M.N.; NELSON, D.L. **Leninguer, Princípios de Bioquímica**. 4° ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

CORBELO-PEREIRA, S.R.C.; DARRONQUI, E.; CONSTANTIN, J.; SILVA, M.H.R.A.; YAMAM, T.O.N.S.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor bearing rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1688, p. 187-196, 2004.

CORREA, M.M.; SAMPAIO, S.V.; LOPES, R.A.; MANCUSO, L.C.; CUNHA, O.A.B.; FRANCO, J.R.; GIGLIO, J.R. Biochemical and histopathological alterations induced in rats *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major neurotoxin tityustoxin-1. **Toxicon**, v. 35, p. 10-53, 1997.

COUTINHO, N.L.R. **Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da aranha marrom, *L. intermedia***. Dissertação de mestrado em Morfologia, Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná, 1996.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular Pathology Technique**. London: Butterworth and Co, 1985.

CUNHA, R.B.; BARBARO, K.C.; MARAMATSU, D.; PORTARO, F.C.V.; FONTES, W.; SOUZA, M.V. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucho* brown spider venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 22 (2), p. 135-146, 2003.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and glycerate-2-phosphate. In BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974. pp. 1446-1551.

DA SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; SANTOS, F.A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. VEIGA, S.S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 42, p. 155-161, 2003.

DA SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, p. 693-709, 2004.

DA SILVEIRA, R.B.; SANTOS, J.F.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, p. 815-822, 2002.

DA SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* venom are endo-beta-n-acetil-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 45, p. 1-11, 2006.

DA SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**. In press, 2007.

DE SOUZA, A.L.; MALAQUE, C.M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C.C.; DUARTE, A.J.; SEGURO, A.C. *Loxosceles* venom – induced cytokine activation, hemolysis, and acute Kidney injury. **Toxicon**, v. 45 (4), p. 421-429, 2007.

DESAI, A.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S. *Loxosceles deserta* spider venom induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in keratinocytes. **Inflammation**, v. 24, p.1-9, 2000.

DEVLIN, T.P. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 6° ed. São Paulo: Blucher, 2007.

DOMINGOS, M.O.; TYNAN, W.; BARBARO, K.C.; PENNY, J.; LEWIS, D.J.M.; NEW, R.R.C. Effect of *Loxosceles gaucho* venom on cell morphology and behaviour in vitro in the presence and absence of sphingomyelin. **Toxicon**, v. 42, p. 439-445, 2003.

FEDATO-JUNIOR, Z.F.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; AMADO, C.B.; VICENTINI, G.E.; PANERARI, A.D.; BRACHT, A.; KELMER-BRACHT, A.M. Gluconeogenesis in the liver of Arthritic rats. **Cell Biochem. Funct**, v. 17, p. 271-278, 1999.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M. C. Q. B.; GRANER, E., MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrogenolytic activities in brown spider (*L. Intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FILHO, G.B. **Bogliolo Patologia**, 7° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

FISHER, M.L. Levantamento das espécies de *L. Heinecken* and *Lowe*, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brazil. **Estudos de Biologia**, 1994.p. 63-88.

FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; ABDULKADER, R.C.R.M. Rhabdomyolysis in presumed viscerocutaneous loxoscelism: report of two cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 287-29, 2002.

FUTRELL, J.M. Loxoscelism. **American Journal Medicine Science**, v.304, p.261-267, 1992.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Color Textbook of Histology**. Philadelphia: W. B.Saunders Company, 1997.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 174, p. 90-99, 1976.

GUTMAN, I.; WAHLEFELD, A.W. Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD⁺. In: BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974. pp.1464-1468.

HEALTH SECRETARY, CURITIBA, PARANÁ, 2002. Acidentes Loxoscélicos – Protocolo técnico e fluxo de atenção em Curitiba.

HOGAN, C.J.; BARBARO, K.C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old Obstacles, new directions. **Annals of Emergency Medicine**, v.44 (6), p.608-622, 2004.

JUNGERMANN, K.; KATZ, N. Metabolic Heterogeneity of liver parenchyma. In: HIES, S. Metabolic compartmentation. Academic Press, p. 411-433, 1982.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KELMER-BRACHT, A.M.; ISHII, E.L.; ANDRADE, P.V.M.; BRACHT, A. Construction of a liver perfusion apparatus for studies on metabolic regulation and mechanisms of drug action. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.27, p. 419-438, 1984.

KEMMELMEIER, F.S.; BRACHT, A. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory mefenamic acid on energy metabolism in the perfused rat liver. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, p. 823-830, 1989.

KEPLER, D.; DECKER, K. Glycogen: Determination with amyloglucosidase. In: BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analyses**. New York: academic Press, 1974. pp. 1126-1131.

KUN, E.; KEARNEY, E.B. Ammonia. In: BERGMEYER. **Methods of enzymatic analysis**. London: academic Press, 1974, pp. 1802-1806.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, v. 29, p. 759-772, 1988.

LUCIANO, M.N. **Estudo da atividade nefrotóxica do veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)**, Dissertação de mestrado em biologia Celular e molecular, biologia Celular. Universidade Federal do Paraná, 2003.

LUCIANO, M.N.; SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52(4), p. 455-467, 2004.

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A Child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Internacional Journal of Dermatology**, v. 39, p. 287-289, 2000.

MALAUQUE, C.M.S.; CASTROVALÊNCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and Epidemiological Features of Definitive and Presumed Loxoscelism in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Trop. S. Paulo*, v. 44(3), p. 139-143, 2002.

MARQUES-DA-SILVA E, FISCHER M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38(4), p. 331-335, 2005.

MARQUES-DA-SILVA E.; SOUZA, S.R.; FISHER M.L. *Loxosceles spider* bites in the state of Paraná, Brazil: 1993-2000. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, v. 12(1), p. 110-123, 2006.

MARTIN-REQUERO, A.; CIPRES, G.; GONZALEZ-MANCHON, C.; AYUSO, M.S.; PARILLA, R. Interrelation ships between ureogenesis and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta*, v. 1158, p. 166-174, 1993.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Peru. *Bol. San. Panam.* v. 103, p. 378-386, 1987.

MEEKS, R.G.; HARRISON, S.D.; BULL, R.J. **Hepatotoxicology**. Florida: Corporate Blvd Boca Raton, 2000.

MEIJER, A.J.; HENSGENS, H.E.S.J. Ureogenesis. In: Heis, S. **Metabolic Compartmentation**. Academic Press, 1982.p. 259-281.

Ministério da Saúde – FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes com animais peçonhentos. Brasília; 1998.

MONTEIRO, C.L.B.; RUBEL, R.; COGO, L.L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Isolation and identification of clostridium perfringens in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia*: Enhancement of the demonecrotic lesion in loxoscelism. *Toxicon*, v. 40, p. 409-418, 2002.

OLIVEIRA, K.C.; DE ANDRADE R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* Spider Venoms. *Toxicon*, v. 37,p. 217-221, 1999.

OLIVEIRA, K.C.; DE ANDRADE, R.M.G.; PIAZZA, R.M.F.; FEDATO - JUNIOR, J.M.C.F.; BERG, C.W.; TAMBOURGI. D.V. Variations in *Loxosceles spider* venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. *Toxicon*, v. 45, p. 421-429, 2005.

OSPEDDAL, K.Z.; APPEL, M.H.; NETO, J.N.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Hystopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Int. J. Exp. Path.* v.84, p. 287-294, 2002.

PAULI, I.; J, PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelismo treatment. **Toxicon**, v. 48 (2), p. 123-137, 2006.

PEDROSA, M.F.F.; Azevedo, I.L.M.J.; ANDRADE, R.M.G.; BERG, C.W.; RAMOS, C.R.R.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, p. 638-645, 2002.

PEICHOTO, M.E.; TEIBLER, P.; RUIZ, R.; LEIVA, L.; ACOSTA, O. Systemic pathological alterations caused by *Philodryas patogeniensis* colubrid snake venom in rats. **Toxicon**, v.48, p. 520-528, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RESS, R.S.; GATES, C.; TIMONS, S.; DES-PRES, R.M.; KING, L.E. Plasma components are requieres for platelet activation by the toxin of *L. Reclusa*. **Toxicon**, v. 26, p. 1035-1046, 1988.

RIBEIRO, L.A.; EICKSDT, V.R.D.; RÚBIO, G.R.B.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ETRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no estado do Paraná (Brasil). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, p. 19-26, 1993.

RIBEIRO, R.O.S. Análise comparativa estrutural e das propriedades biológicas das toxinas dermonecroticas recombinantes LiRecDT1, LiRecDT2 e LiRecDT3 do veneno da aranha marrom. **Dissertação de mestrado em Biologia Celular e molecular, Biologia Celular**. Universidade Federal do Paraná, 2007.

RIBEIRO, R.O.S.; CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, L.H.; SADE, Y.B.; PALUDO, K.S.; RIBEIRO, A.S.; DE MOURA, J.; OLÓRTEGUI, C.C.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.50 (8), p. 1162-1174, 2007.

ROBBINS, S.R.; COTRAN, R.S.; KUMER, V. COLLI, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6°ed. Rio de janeiro: Guanabara koogan, 2001.

SAMINATHAN, R.; BABUJI, S.; SETHUPATHY, S.; VISWANATHAN, P.; BALASUBRAMANIAN, T.; GOPALAKRISHANAKONE, P. Clinic-toxinological characterization of the acute effects of the venom of the marine snail, *Conus lorioisii*. **Acta Tropica**, v. 97, p. 75-87, 2006.

SANTOS, V.L.P.; FRANCO, C.R.C.; VIGGIANO, R.L.L.; SILVEIRA, R.B.; CANTÃO, M.P.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Strutural and ultrastrutural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, v. 38, p. 265-285, 2000.

SCHOLZ, R.; BUCHER, T. hemoglobin-free perfusion of rat liver. In CHANCE, B.; ESTABROOK, R.W.; WILLIAMSON, J.R. **Control of Energy metabolism**. New York: Academic Press, 1965. pp.393-414.

SEZERINO, U.P.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K. A clinical and epidemiological study of loxosceles spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Annals of Emergency Medicine**, v. 92, p. 546-548, 1998.

SHEN, S.Q.; CHEN, G.; WANG, X.M.; SUN, Q.Y.; GUO, G.; XIONG, Y.L.; WEI, Q.X.; WANG, H.; CHEN, L.J.; WU, Y.; CHEN, S. A study of cobra venom factor in Ex vivo pig liver perfusion model. **Transplantation proceedings**, v. 33, p. 3860-3861, 2001.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clinical in Dermatology**, v. 24, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI, D.V.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W.; MORGAN, BDA SILVA M.; BILLINGTON, S.J.; ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; SONGER, J.G.; VAN DEN BERG, C.WP.; DE ARAÚJO, P.S.; ALVES, E.W.; SILVA, E.W.D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent haemolyses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 251, p. 366-373, 1998.

TAMBOURGI, D.V.; MORGAN, B.P.; DE ANDRADE, R.M.; MAGNOLI, F.C.; VAN DEN BERG, C.W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95 (2), 683-691, 2000.

TAMBOURGI, D.V. CAVALCANTE, D.P.; ANDRADE, R.M.G.; PEDROSA, M.F.F.; MAGNOLI, F.C.; MOURGAN, B.P.; VAN DER BERG, C.W. Loxosceles Sphingomyelinases Induces complement- dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinases expression. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 725-731, 2005.

TAVARES, F.L.; SILVA, M.C.C.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C.; REBECCHI, I.M.M.; MARTINS, S.S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* spider venom. **Human & Experimental Toxicology**, v. 23, p. 477-486, 2004.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; DOS SANTOS, V.L.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, v. 34 (4), p.587-607, 1999.

VEIGA, S.S.; SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine protease in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38 , p. 825-839, 2000.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; PORCIONATTO, M.A.; MANGILI, O.D.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thrombosis Research**, v. 102, p. 229-237, 2001.

WILLIAN, M.J.; DA, X.; LOFTAS, J.C.; GINSBRORG, M.H. Platelet adhesion receptor. **Semin. Cell. Biol**, v. 6., p. 305-314, 1995.

WILLIAMS, J.F.; SIDDIQUI, R.A. Biochemistry of cancer cachexia: reviews of results, a new hypothesis and a proposal for treatment. **Med. Sci. Res**, v. 18, p. 3-10, 1990.
YASSUDA-FILHO, P.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; LOUSANO, S.H.; BRACHT, L.; KELMER-BRACHT, A.M. The urea cycle in the liver of arthritic rats. **Mol Cell. Biochem.**, v. 243, p. 97-106, 2003.

YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparision of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *L. Rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, v. 39, p. 391-400, 2001.

ZAMBRANO, A.; GONZÁLES, J.; CALLEJAS, G. Desenlace fatal por loxoscelismo cutáneo visceral. **Revista Médica de Chile**, v. 133, p. 219-223, 2005.

ZANETTI, V.C.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S., GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by Brown spider venom. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 13, p. 1-14, 2002.

